

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUCIMARA FÁTIMA BELETINI

Avaliação da eficácia dos coagulantes *Moringa oleifera* e sulfato de alumínio na remoção de oocistos de *Toxoplasma gondii* e ovos de *Toxocara* spp. em água experimentalmente contaminada

Maringá
2018

LUCIMARA FÁTIMA BELETINI

Avaliação da eficácia dos coagulantes *Moringa oleifera* e sulfato de alumínio na remoção de oocistos de *Toxoplasma gondii* e ovos de *Toxocara* spp. em água experimentalmente contaminada

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde
Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Falavigna Guilherme.

Maringá
2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre ter abençoado e iluminado o meu caminho.

Aos meus queridos e amados pais por todo o incentivo, amor, dedicação e confiança durante toda a minha vida.

Ao meu irmão Jocemar, por todo o apoio, incentivo e ajuda durante todos os períodos da minha formação profissional.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia, pela sua dedicação, paciência e profissionalismo, que foram fundamentais para a realização dessa pesquisa, a quem tenho muito respeito e admiração.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Cristiane, Priscilla e Silvana, pelos ensinamentos, paciência e orientação durante a pesquisa. Obrigada por toda contribuição.

A todos os funcionários e técnicos dos laboratórios de parasitologia, engenharia química, do COMCAP, e da Universidade Estadual de Londrina.

Às minhas colegas de laboratório Caroline, Fernanda, Renata, Ariella, Elisama, Katyelle, Hevillyn, Marcella, Francine, Amanda, por todo companheirismo e colaboração durante essa jornada.

Às amigas que eu construí em Maringá e que se tornaram a minha segunda família e que levarei no meu coração para o resto da minha vida, Caroline, Fernanda, Katyelle, Jenniffer, Emanuele, obrigada pelos momentos de descontração que passamos juntas.

A todos que acompanharam essa trajetória e torceram pelo meu sucesso, sem vocês com certeza eu não conseguiria chegar até aqui sozinha.

EPÍGRAFE

Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de água no
mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse
uma gota.

(MADRE TERESA DE CALCUTA)

Avaliação da eficácia dos coagulantes *Moringa oleifera* e sulfato de alumínio na remoção de oocistos de *Toxoplasma gondii* e ovos de *Toxocara* spp. em água experimentalmente contaminada

RESUMO

A contaminação dos recursos hídricos constitui fator de risco para a saúde humana, uma vez que a água pode disseminar agentes biológicos como protozoários e helmintos, incluindo *Toxoplasma gondii* e *Toxocara* spp., respectivamente. Diversas formas evolutivas como oocistos, cistos e ovos de parasitos são resistentes a desinfetantes, como o cloro que é utilizado nos processos convencionais das estações de tratamento de água. A adição de coagulantes é uma medida importante no tratamento da água, uma vez que remove as impurezas, clarificando a água. Neste contexto, foi avaliado o efeito dos coagulantes sulfato de alumínio e *Moringa oleifera* na remoção de oocistos de *Toxoplasma gondii* e de ovos de *Toxocara* spp. Foram utilizados dois tipos de amostras de água, uma constituída de 1000mL de água destilada, artificialmente contaminada com 10^6 oocistos de *T.gondii* e outra composta de 1000 mL de água bruta também contaminada com 10^6 oocistos de *T.gondii*. Da mesma forma, o mesmo volume de cada tipo de água foi contaminado com 800 ovos de *Toxocara* spp. Em seguida, foram adicionados os coagulantes sulfato de alumínio ou extrato de sementes de *M. oleifera* a 1%, foram adicionados, na concentração de 50 mg/L, para o experimento com *T.gondii* e 10 mg/L, 30 mg/L e 50 mg/L para os testes com *Toxocara* spp. As amostras foram deixadas sedimentar por 20 minutos para o sulfato e 60 minutos para as amostras com *M. oleifera*. Todo o processo foi realizado em Jar Test, para em seguida analisar os sobrenadantes das amostras. O proveniente de oocistos de *T. gondii* foram filtradas a vácuo em membrana de acetato de celulose e o material retido foi removido mecanicamente e centrifugado até um volume de 1 mL de suspensão. A extração do DNA foi realizada com o *kit* comercial ReliaPrep™ Gdna Tissue Miniprep System e amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os iniciadores B1 (B22–B23) e Toxo4–5. Foi também realizada a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR), e observação em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Já para as amostras de *Toxocara* spp., todo o sobrenadante foi analisado por microscopia óptica para avaliação da eficiência de remoção e o sedimento foi mantido por 20 dias em temperatura ambiente (25-30°C) para verificar a viabilidade dos ovos. Estas estruturas também foram observadas em MEV. Foi detectado presença de DNA de *T. gondii* em todas as amostras submetidas ao coagulante natural ou químico. Todavia, a utilização de sulfato de alumínio, em água bruta, proporcionou maior remoção de oocistos se comparado ao coagulante natural, ou ao seu controle positivo. Foram encontrados escassos ovos de *Toxocara* spp. nas amostras do experimento, e nenhum ovo foi detectado no sobrenadante de água bruta após a utilização de *M. oleifera*. No sedimento, foi observado que os ovos estavam recobertos com o coagulante, e de maneira mais densa com o sulfato de alumínio. Todavia, nenhum coagulante foi capaz de alterar o embrionamento dos ovos. O coagulante químico, em água bruta é capaz de reduzir satisfatoriamente a quantidade de oocistos enquanto que o tratamento alternativo por *M. oleifera* não reduziu significamente. Com isto o material mantido nas estações de tratamento de água ou em pequenas comunidades que utilizam *M. oleifera* como forma de descontaminar a água não impede a manutenção destas formas infectantes no ambiente.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, *Toxocara*, tratamento da água, Reação em Cadeia da Polimerase, Microscopia Eletrônica de Varredura.

Evaluation of the efficacy of *Moringa oleifera* and aluminum sulfate coagulants in the removal of *Toxoplasma gondii* oocysts and *Toxocara* spp. eggs in experimentally contaminated water

ABSTRACT

Water resources contamination is a risk factor to the population health since water can disseminate biological agents such as protozoa and helminths, including *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp. Several evolutionary forms such as oocysts, cysts and parasite eggs are resistant to disinfectants, such as chlorine that is used in the conventional processes of water treatment plants. Thus, the addition of coagulants is an important step in water treatment, as it removes the impurities. In this work, it was evaluated the efficacy of *Moringa oleifera* seed extract and aluminum sulfate as coagulants in the removal of *T. gondii* oocysts and *Toxocara* spp. eggs. Two types of water samples were used, one consisting of 1000 mL of artificially distilled water contaminated with 10^6 *T.gondii* oocysts and another composed of 1000 mL of raw water also contaminated with 10^6 *T.gondii* oocysts. Likewise, the same volume of each type of water was contaminated with 800 eggs of *Toxocara* spp. The coagulants were added in concentration of 50mg/L for the experimente with *T. gondii* and in three different concentrations for the *Toxocara* spp. experiment, 10 mg/L, 30 mg/L e 50 mg/L. The samples were allowed to settle for 20 minutes when using the sulfate and 60 minutes for the samples wich *M. oleifera* was added. After coagulation process performed on Jar Test, the supernatant from *T. gondii* oocysts was removed and vacuum filtered on cellulose acetate membrane and the retained material was mechanically removed and centrifuged to a volume of 1 ml of suspension. The obtained material was used to search for *T. gondii* DNA using the commercial kit ReliaPrep™ Gdna Tissue Miniprep System and amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR) using the primers B1 (B22-B23) and Toxo4-5. It was also performed the quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR), and observation in Scanning Electron Microscopy (SEM). For the samples of *Toxocara* spp., all the supernatant was analyzed by optical microscopy to evaluate the removal efficiency and sediment was kept for 20 days at room temperature (25-30°C) to verify egg viability. These structures were also observed in SEM. *T. gondii* DNA was detected in all samples submitted to natural or chemical coagulant, with no difference in deposition on oocysts. However, the use of aluminum sulfate in raw water provided greater removal of oocysts when compared to control sample (without coagulant) or to the natural coagulant. Small number of *Toxocara* spp. eggs was detected in distilled water and no eggs were detected in raw water supernatant after use of *M. oleifera* seed extract. It was possible to observe that the coagulants covered the eggs, with a thicker layer of aluminum sulfate than *M. oleifera*. However, no coagulants were able to modify the viability of the eggs of *Toxocara* spp. The chemical coagulant in raw water is able to satisfactorily reduce the amount of oocysts while the alternative treatment by *M. oleifera* did not significantly reduce. With this, the material kept in the water treatment plants or in small communities that use *M. oleifera* as a way to decontaminate the water does not prevent the maintenance of these infecting forms in the environment.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, *Toxocara*, Water treatment, Polymerase Chain Reaction, Microscopy Electron Scanning.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e da publicação científica (Capítulo II):

Water Research (artigo 1) Disponível em:
<<https://www.journals.elsevier.com/water-research/>>

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I.....	11
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	11
1.2 Histórico.....	11
1.3 Morfologi e ciclo biológico.....	12
1.4 Diversidade genética.....	13
1.5 Fontes de Infecção.....	13
1.6 Ocorrência de <i>T. gondii</i> na água.....	13
1.7 Manifestações clínicas.....	14
1.8 <i>Toxocara</i> spp.....	15
1.9 Histórico.....	15
1.10 Epidemiologia e Ciclo de vida.....	15
1.11 Morfologia.....	16
1.12 Infecção humana e manifestações clínicas.....	16
1.13 Fatores de risco para <i>Toxocara</i> spp.....	17
1.14 Tratamento de água.....	17
1.15 Sulfato de alumínio.....	18
1.16 <i>Moringa oleifera</i>	18
1.17 Justificativa.....	19
1.18 Objetivos.....	20
1.19 Referências.....	20
2 CAPÍTULO II.....	28
2.1 Article: Effect of coagulants <i>Moringa oleifera</i> seed extract and aluminum sulfite on <i>Toxoplasma gondii</i> oocysts and <i>Toxocara</i> spp. eggs in water.....	29
3 CAPÍTULO III.....	46
3.1 Conclusões.....	46
3.2 Perspectivas futuras.....	46

CAPÍTULO I

Toxoplasma gondii

HISTÓRICO

Em 1908, o protozoário *Toxoplasma gondii* foi observado ao mesmo tempo em dois países. Na Tunísia, localizada no Norte da África por Nicolle e Manceaux, em baço, fígado e sangue de um pequeno roedor africano (*Ctenodactylus gundi*), e no Brasil, Estado de São Paulo, por Splendore que o identificou em coelhos de laboratório. O primeiro o denominou de *Leishmania gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909) e o segundo de *Toxoplasma cuniculli* (SPLENDORE, 1909). A adequação da nomenclatura ocorreu no ano seguinte considerando as características morfológicas do parasito, e assim denominado *Toxoplasma gondii*, filo Apicomplexa, em que o gênero é derivado do grego toxon (arco) e plasma (molde), devido ao formato curvo e crescente (NICOLLE; MANCEAUX, 1909).

A primeira descrição da infecção em humanos foi em uma criança residente na cidade de Praga com 11 meses, que faleceu devido a hidrocefalia congênita, microftalmia e presença de cistos oculares (JANKU, 1923). Mais tarde, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, Torres encontrou lesões no sistema nervoso central, coração e músculo esquelético de uma menina recém-nascida (GUIMARÃES, 1943). Em 1940, Pinkerton e Weinman, foram os primeiros a relatar a doença em um adulto de 22 anos, residente no Peru, e um ano depois Pinkerton e Henderson também descreveram outros dois casos em adultos, idade entre 40 e 50 anos, em Saint Louis, Missouri. Esses foram os primeiros relatos da doença em adultos com ausência de sinais neurológicos (WEISS; DUBEY, 2009). Em 1948, a técnica sorológica através do teste do corante, *Sabin-Feldman dye test*, possibilitou determinar anticorpos anti-*T.gondii*. E as formas clínicas da doença foram relatadas por Frenkel em 1971, sendo a retinocoroidite o sinal clínico mais frequente na fase crônica, e a maioria dos pacientes assintomático (FRENKEL et al., 1971).

Hutchison em 1965 descreveu o ciclo evolutivo do *Toxoplasma gondii* no gato, pela eliminação das formas contaminantes nas fezes. Já, em 1965 (HUTCHISON et al., 1971; FRENKEL et al., 1971), foi descrita a fase sexuada desse protozoário no intestino delgado do gato doméstico. Entre os anos de 1975-1976 este protozoário foi descrito em animais silvestres, incluindo o envolvimento de outros felídeos, além de gatos domésticos (PIZZI, 1978; FIALHO et al., 2009).

MORFOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO

Protozoário intracelular obrigatório, *T. gondii*, possui elevada capacidade de invadir células, tecidos e hospedeiros (FRENKEL et al., 1970).

T. gondii apresenta três formas infectantes, durante seu ciclo biológico, taquizoítas, bradizoítas e oocistos. Os taquizoítas são formas encontradas no interior de células nucleadas e nos líquidos corporais (sangue, saliva, leite, entre outras) e responsáveis pela fase aguda da infecção em hospedeiros intermediários (SOUZA et al., 2010; NEVES, 2003). A transmissão por esta forma evolutiva pode ocorrer por via transplacentária, ou ingerido por seres humanos ou qualquer outro animal de sangue quente, uma vez que o parasito pode migrar através da parede intestinal, sendo levado do sangue para outros tecidos, incluindo o sistema nervoso central (JONES et al., 2014). Já, os bradizoítas formas encontradas no interior de cistos teciduais, são responsáveis pela fase crônica da infecção em hospedeiros intermediários (DUBEY et al., 1998; PRADO et al., 2011). Os bradizoítas podem ser encontrados no tecido muscular esquelético, cardíaco, retina e tecido nervoso, e demais órgãos (ORÉFICE et al., 2010; PRADO et al., 2011). A terceira forma evolutiva compreende os oocistos. Os oocistos esferóides (não infecciosos) (10-12 μm) são excretados em fezes de felídeos e tornam-se infecciosos após o processo de esporulação (DUBEY et al., 1970). Os oocistos esporulados são ovoides, medem 11x13 μm e possuem dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos infecciosos em forma de banana (FERGUSON et al., 1979; SPEER et al., 1998). Os oocistos de *T. gondii* são altamente resistentes as condições ambientais, esta resistência a estressores químicos e físicos como ozônio, UV e produtos a base de cloro é atribuído a parede do oocisto (JONES e DUBEY, 2010; DUMÈTRE e DARDÉ, 2003; BELLI et al., 2006). A parede do oocisto é composta por duas camadas, sendo que a camadas mais externa é mais fina que a camada interna (SPEER et al., 1998). A parede do oocisto é composta por mais de 90% de proteína, como a tirosina e a cisteína que foram identificadas na parede externa (POSSENTI et al., 2010) e em menores frações na parede interna (FRITZ et al., 2012; MAI et al., 2009).

O ciclo biológico do *T. gondii* é constituído de duas fases, sexuada, que ocorre no interior das células epiteliais do intestino delgado dos hospedeiros definitivos (felídeos) e a assexuada, que se passa no interior das diversas células e tecidos dos hospedeiros intermediários, mas também pode ocorrer nos tecidos dos hospedeiros definitivos. Na fase assexuada após a ingestão de cistos ou oocistos ocorre a liberação de bradizoítas e esporozoítas, respectivamente. As formas infectantes são liberadas no lúmen intestinal invadindo os enterócitos do tecido hospedeiro, são transformados em taquizoítas e se multiplicam localmente, para em seguida se espalhar pelo organismo, via hematogênica (DUBEY et al.,

1998). O sistema imunológico consegue destruir os taquizoítas (fase aguda), no entanto, os bradizoítas (fase crônica) que estão protegidos pela parede do cisto, no meio intracelular podem permanecer íntegros e assim viáveis por muitos anos em estado latente (MOLINARO et al., 2012).

DIVERSIDADE GENÉTICA

Os isolados de *T. gondii* na América do Sul exibem uma ampla variabilidade genética em comparação com os da América do Norte e Europa, onde os tipos clonais clássicos mais comumente encontrados são I, II e III com evidências de poucas recombinações genéticas (PENA et al., 2008; SU et al., 2012). No Brasil, a maioria das cepas encontradas não são arquetípicas, algumas das linhagens são consideradas tipos clonais brasileiros sendo denominadas de BrI, BrII, BrIII e BrIV (PENA, et al., 2008). Além disso, as infecções por *T. gondii* no Brasil tendem a ser mais severas que aquelas em países que apresentam típicas estruturas celulares clonais. Essa patogenicidade do *T. gondii* no Brasil, pode estar associada com cepas atípicas decorrentes da recombinação sexual frequente desse parasito (AJZENBERG et al., 2004).

FONTES DE INFECÇÃO

O homem e os animais podem adquirir a toxoplasmose através da ingestão de água ou alimentos contaminados por oocistos esporulados, cistos presentes em carne ou seus derivados crus ou mal cozidos (DUBEY et al, 2010), transmissão vertical, e mais raramente, pela ingestão de taquizoítas presentes em leite contaminado, transfusão sanguínea, transplantes de órgãos (NEVES, 2003; DUBEY, 2006). Além disso, o solo contaminado com os oocistos de *T. gondii* provenientes de felídeos, como os gatos domésticos também é uma relevante forma de infecção. No entanto, o contato com o animal não resulta em infecção uma vez que os oocistos não aderem aos pelos do mesmo (DUBEY et al., 2006).

OCORRÊNCIA DE *T. gondii* NA ÁGUA

A água foi reconhecida como um importante veículo de propagação de *T. gondii* (VIEIRA et al., 2015). Dessa maneira, os oocistos que são liberados nas fezes dos felídeos infectados podem permanecer viáveis no meio ambiente contaminando os mananciais (TORREY E YOLKEN, 2013; DUMÉTRE E DARDÉ, 2003). Como são resistentes à cloração e processos

de filtração inadequados, tornam-se uma séria ameaça para a população (DEMIREL et al., 2014).

Segundo Bowie et al. (1997), no Canadá, em 1995, houve um crescente número de casos de toxoplasmose aguda. Após a análise dos casos foi observado que a provável via de transmissão foi a água (clorada e não filtrada) fornecida pelo sistema de distribuição local. Um outro estudo desenvolvido por Mahdy et al. (2017) com gestantes residentes nas comunidades rurais de Taiz no Yemen verificou uma positividade de 46,2% para *T. gondii* sendo, também, a água a principal fonte de infecção. Já no Brasil, o primeiro surto descrito de toxoplasmose causado pela água foi em 2001 na cidade de Santa Isabel do Ivaí, no Noroeste do Estado do Paraná. Houve contaminação de um reservatório de água da cidade com oocistos liberados por gatos que viviam nas imediações (DE MOURA et al., 2006, FUNASA, 2002).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A toxoplasmose geralmente é uma doença assintomática, em que a maioria dos indivíduos soropositivos desconhecem que estão infectados por não apresentarem sintomas. Já os indivíduos sintomáticos podem apresentar linfadenopatia, febre, fraqueza muscular (MEAD et al., 1999), em que as formas mais graves da doença acontecem geralmente em indivíduos imunocomprometidos (DUBEY, 2010) e em período gestacional (MONTROYA e REMINGTON, 2008). Na infecção congênita, pode ocorrer aborto ou o feto pode nascer com sérios problemas como deficiência visual, hidrocefalia, convulsões e calcificações intracerebrais (DUNN et al., 1999). O desfecho da transmissão durante a gestação é influenciado por fatores como idade gestacional no momento da infecção, estado imune da gestante, parasitemia materna, tratamento quimioterápico, virulência e genótipo do *T. gondii* e tamanho do inóculo (CARNEIRO, et al., 2013; KRAVETZ, 2013). No Brasil, os genótipos circulantes costumam apresentar virulência de moderada a alta (PENA et al., 2008), e incidência de casos congênitos entre 0,3 e 5,0 por 1000 nascidos vivos (SEGUNDO, et al., 2004; LAGO et al., 2009).

A maior severidade da toxoplasmose ocular na América do Sul, inclusive com desfechos mais frequentes e mais graves de coriorretinite, é atribuída à diversidade genética do *T. gondii* (SILVEIRA et al., 2015; GRIGG et al., 2015) com polimorfismos únicos e que não podem ser agrupados em nenhum dos 12 haplogrupos descritos (SU et al., 2012; HIGA, et al., 2014). Mesmo que em indivíduos imunocompetentes a toxoplasmose geralmente seja assintomática. No Brasil, infecções pós-natais são responsáveis por casos de lesões na retina, que podem se

desenvolver logo após, meses ou anos após a ocorrência da infecção (GRIGG et al., 2015; SILVEIRA et al., 2015).

Toxocara spp.

HISTÓRICO

Em 1950, Wilder descreveu a infecção humana por *Toxocara* spp após ter identificado uma larva de nematódeo de uma espécie desconhecida dentro do granuloma retiniano de uma criança (WILDER, 1950). Já em 1952, Beaver e colaboradores relataram, em três crianças, eosinifilia crônica, hepatomegalia, infiltração pulmonar, febre, tosse devido a penetração da larva no fígado e a migração para outros órgãos. A partir desse grupo de pacientes, foi descrita a maioria dos aspectos clínicos da Larva *migrans* visceral e através de biópsias de tecidos foram classificados os agentes causais como *Toxocara canis* ou *Toxocara cati* (BEAVER et al., 1952).

EPIDEMIOLOGIA E CICLO DE VIDA

O gênero *Toxocara* pertence a classe Nematoda ordem Ascaroidea e Superfamília Ascaridoidea e compreende 21 espécies dentre elas *Toxocara canis* e *Toxocara cati* que são espécies mais comumente envolvidas na toxocariase humana (DESPOMMIER, 2003; DUBNÁ et al., 2007).

A toxocariase é uma doença de distribuição mundial, que ocorre tanto em países com condições sanitárias precárias como em países desenvolvidos (DESPOMMIER, 2003; DUBNÁ et al., 2007). *T. canis* e *T. cati* são reconhecidos como os agentes etiológicos da doença, que possuem como hospedeiros definitivos o cão e o gato, respectivamente, habitando o lúmen do intestino delgado (DESPOMMIER, 2003).

T. canis pode atingir uma alta prevalência devido ao grande número de ovos excretados e a resistência desses ovos no meio ambiente (CHIEFFI et al., 1988; COSTA-CRUZ et al., 1994; OVERGAAUW, 1997; SANTARÉM et al., 1998). Após a ingestão de ovos contendo a larva L3 por hospedeiros definitivos, as larvas migram para o intestino, caem na corrente sanguínea e são transportadas para vários tecidos, principalmente fígado e pulmão. As larvas presentes nos pulmões sofrem migração traqueal ascendente e são deglutidas, retornando ao intestino onde ocorre as duas últimas fases do ciclo (SANTARÉM et al., 2011).

MORFOLOGIA

Os nematódes adultos da espécie *Toxocara canis* possuem na extremidade anterior uma boca rodeada por três lábios, sendo um dorsal e dois subventrais e em ambos os sexos existe uma proeminente asa cervical em formato de lança. Os machos medem de 4 a 6 cm de comprimento e as fêmeas medem de 6,5 cm a mais de 15 cm de comprimento (Bowman, 2014). Os exemplares adultos de *Toxocara cati*, são muito semelhantes ao *T. canis*, mas possuem asa cervical em formato de seta menos comprida e mais larga e tamanho menor quando comparado ao *T. canis* (Foreyt, 2001; Bowman, 2014).

Os ovos recuperados de amostras fecais são uniformemente arredondados ou ovais, contendo no centro um embrião unicelular redondo e de coloração escura. O ovo apresenta uma dupla membrana, bastante espessa, rugosa e ondulada. Já os ovos recuperados do solo, apresentam a parede externa clara e ondulada e no centro o embrião em desenvolvimentos ou a presença de larvas L3 perfeitamente desenvolvida, transparente e em constante movimento dentro do ovo (ARAUJO, 1972).

INFECÇÃO HUMANA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A infecção humana ocorre principalmente através da ingestão acidental de ovos embrionados que estão presentes no solo, água (GLICKMAN e SCHANTZ, 1981; CASTILLO et al., 2000) ou pela ingestão da carne dos hospedeiros intermediários contendo as larvas (DESPOMMIER, 2003; MORIMATSU et al., 2006; YOSHIKAWA et al., 2008; CHOI et al., 2012). Após a ingestão, as larvas penetram na parede intestinal e migram através dos tecidos principalmente para o fígado, pulmões, músculos e tecido nervoso resultando em larva *migrans* visceral ou ocular (NAGAKURA et al., 1989; OVERGAAUW, 1997; CHIEFFI e LESCANO, 2005; DESPOMMIER, 2003). No entanto, muitas infecções por *Toxocara* spp. permanecem assintomáticas, portanto não são diagnosticadas (WON, et al., 2008). O quadro clínico depende muito do número de larvas, da localização dessas e da imunidade do indivíduo (GLICKMAN et al., 1979; KAYES, 1997). A síndrome Larva *migrans* Visceral (VLM) acontece geralmente quando há altas cargas parasitárias ou infecções recorrentes, geralmente ocorre em crianças de um a sete anos, mas também pode acometer adultos. Os sinais e sintomas incluem febre, hepatomegalia, dor abdominal, vômitos, diarreia, tosse / sibilância, asma, perda de peso, fadiga e dor de cabeça (STOICESCU et al., 2011). A síndrome Larva *migrans* Ocular (OLM) ocorre em crianças de cinco a dez anos, apresenta comprometimento unilateral da visão acompanhado de estrabismo. A invasão da larva na retina leva a formação de granulomas que criam distorção, heteropia ou desprendimento da mácula geralmente resultando em cegueira (GILLESPIE et

al., 1993; WOODHALL et al., 2012). Outra manifestação inclui a invasão do *Toxocara* spp. no Sistema Nervoso Central (SNC) atingindo o cérebro e a medula espinhal que é conhecida como neurotoxocarose, causando meningite, encefalite, mielite, vasculite cerebral e convulsões. Essa manifestação depende de múltiplos fatores como o número de larvas ingeridas, grau de exposição e fatores genéticos do hospedeiro (XINOU et al., 2003).

FATORES DE RISCO PARA *Toxocara* spp.

Os fatores de risco variam consideravelmente em diferentes partes do mundo. Pobreza, nível baixo de escolaridade, falta de higiene, geofagia e alto número de hospedeiros definitivos não tratados e de ovos liberados pelas fêmeas do parasito favorecem a contaminação do solo (DUNSMORE et al., 1984; OVERGAAUW, 1997; WON et al., 2008; LEE et al., 2010). A presença de ovos viáveis de geohelminthos na superfície do solo apresenta potenciais riscos para a saúde pública principalmente porque esses ovos são resistentes ao clima adverso e a agentes químicos. Os ovos do *Toxocara* spp. desenvolvem-se melhor em solo do tipo argiloso, principalmente quando não há exposição direta a luz solar (GLICKMAN e SCHANTZ, 1981). A contaminação do solo parece ser o indicador mais comum da infecção em humanos (BLASZKOWSKA et al., 2011). Tiyo et al. (2008), observou altas taxas de ovos de *Toxocara* spp. em praças públicas utilizadas para atividades de lazer, independente da época do ano. Assim como, outro estudo desenvolvido por Paludo et al. (2007) em Maringá, no Estado do Paraná, região sul do Brasil, que detectou taxa de 28,8% de crianças soropositivas para *Toxocara*.

Além disso, a água também é um importante veículo de transmissão de *Toxocara*, conforme mostra o estudo desenvolvido na França por Schwartzbrodand e Banas, (2003) que detectou alta prevalência de ovos de *Toxocara* (77,4%) em estações de tratamento de água residuais.

TRATAMENTO DA ÁGUA

A tecnologia convencional para tratamento da água consiste nos processos de coagulação química, floculação, sedimentação, filtração e desinfecção (YIN, 2010). O processo visa a remoção de sólidos presentes em efluentes e a precipitação dos mesmos através da adição de produtos químicos coagulantes. Em seguida é realizado processo de mistura rápida para dispersar a sujidade e posteriormente a mistura lenta para a formação de flocos capazes de sedimentarem (MANCUSO et al., 2003). Entre os coagulantes químicos mais utilizados no tratamento de água estão o sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3$) e o cloreto férrico ($FeCl_3$) (PRITCHARD et al., 2010).

SULFATO DE ALUMÍNIO (AL₂(SO₄)₃)

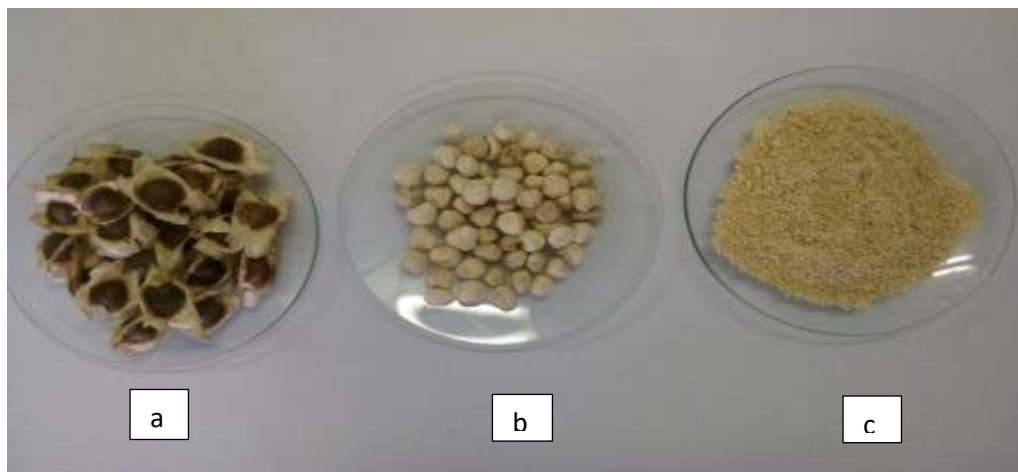
É um coagulante de grande utilização no tratamento de água por ser um produto químico de fácil manuseio e baixo custo. A dosagem ideal do coagulante está relacionada com as características da água bruta, uma vez que a utilização em excesso do produto gera aumento nos custos do tratamento e preocupações de saúde pública, enquanto que uma dosagem inferior à necessária pode comprometer a qualidade final da água (CASEY, 1997). Uma característica negativa quanto ao uso desse coagulante é a quantidade de lodo proveniente no final do processo de tratamento de água. É necessário enfatizar que esse lodo formado não é biodegradável e pode ser um contaminante do meio ambiente (CARVALHO, 2008). A exposição ao alumínio residual utilizado no tratamento da água também é um ponto negativo pois pode causar o desenvolvimento de lesões cerebrais em seres humanos (MANIVANNAN et al., 2015; CHEN et al., 2016). Portanto, é essencial o controle rígido da presença dos metais tanto na água potável quanto na água dos mananciais (PRITCHARD et al., 2010). A Food and Drug Administration (FDA - EUA) determinou que o limite de alumínio para a água engarrafada é de 0,2 mg / L (ATSDR, 2008).

Moringa oleifera

Pertencente à família *Moringaceae*, o gênero *Moringa* possui 14 espécies, sendo uma planta tropical nativa da Índia, já cultivada em outras regiões tropicais. Por não ter exigências quanto ao tipo de solo, é facilmente propagada para vários locais com baixa pluviosidade e climas quentes, desde que os solos não sejam encharcados e as temperaturas mínimas sejam de pelo menos 8°C (POUMAYE et al., 2012).

As árvores medem entre cinco e 12 metros de comprimento e tem suas sementes produzidas em vagens (ABALIWANO et al., 2008). Essas sementes contêm composto ativo capaz de atuar em sistemas coloidais neutralizando cargas e formando pontes entre as partículas. As sementes podem ser preparadas tanto com solução aquosa como solução salina e quando dissolvidas na água tem a capacidade de favorecer a coagulação e floculação das impurezas, reduzir a turbidez, a cor, e a remoção de microrganismos como bactérias, algas e protozoários intestinais como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (PATERNIANI et al., 2010; NISHI et al., 2011), contribuindo na qualidade da água, com baixo custo (CHUANG et al., 2007; COELHO et al., 2009; NKURUNZIZA et al., 2009; MADRONA et al., 2010). Além disso, apresenta propriedades nutricionais e medicamentosas (KATAYON et al., 2006; BHATIA et al., 2007), alimentar (folhas, frutos verdes, flores e sementes torradas); como forragem (folhas, frutos e sementes); combustível (madeira e óleo); na indústria de cosméticos, além de ser rica em

vitamina A superando à quantidade encontrada em olerícolas consagradas como brócolis, cenoura, couve, espinafre e alface (BEZERRA et al., 2004).



Fonte: Lima (2015).

Figura 1: Sementes de *M. oleifera* com casca (a), sem casca (b) e triturada (c).

JUSTIFICATIVA

A elevada prevalência de casos de toxoplasmose e toxocaríase humana, a resistência dos oocistos de *T. gondii* e de ovos de *Toxocara* spp. no meio ambiente e a necessidade de estudos de processos de tratamento de água alternativos ao processo convencional justificam o uso de coagulantes para a remoção destas formas em ambientes aquáticos. Em condições ambientais adequadas, os oocistos de *T. gondii* e os ovos de *Toxocara* spp. podem se tornar viáveis e resistentes por longos períodos podendo contaminar frutas, verduras e, principalmente, a água causando a infecção em humanos e animais.

O tratamento da água consiste na remoção de impurezas através dos processos de coagulação e floculação e o coagulante mais utilizado nas ETAs é o sulfato de alumínio. No entanto, esse produto apresenta alguns inconvenientes como traço residual de metal na água tratada, o que podem ocasionar danos indesejáveis aos indivíduos, principalmente ao sistema nervoso central, bem como ao meio ambiente, por acumular alta produção de lodo nas ETAs. Uma alternativa aos coagulantes químicos são os coagulantes naturais como as sementes de *Moringa oleifera* que apresentam algumas vantagens por não exigir ajustes de pH e alcalinidade, não causar problemas de erosão, ser de baixo custo, biodegradável, não ser tóxica e produzir baixo volume de lama. Estudos laboratoriais tem demonstrado sucesso na utilização destas sementes na remoção de bactérias, algas e protozoários intestinais como *Cryptosporidium*

spp. e *Giardia* spp. no ambiente aquático. No entanto, não há experimentos com oocistos *T. gondii* e ovos de *Toxocara* spp.

OBJETIVOS

Geral

Verificar a remoção e o efeito dos coagulantes sulfato de alumínio e extrato de sementes de *M. oleifera* sobre os oocistos de *T. gondii* e ovos de *Toxocara* spp. em diferentes tipos de água contaminadas experimentalmente.

Específicos

Identificar qual dos coagulantes foi mais eficiente na remoção de oocistos de *T. gondii* e ovos de *Toxocara* spp., nos diferentes tipos de água.

Avaliar se os coagulantes reduzem a turbidez da água.

Verificar como os coagulantes se depositam sobre os oocistos de *T. gondii* e sobre os ovos de *Toxocara* spp.

Observar o efeito dos coagulantes na viabilidade dos ovos de *Toxocara* spp.

REFERÊNCIAS

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Aluminum. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, USA, 2008.

ARAUJO, P. Observações pertinentes as primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *A. suum* e *Toxocara canis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, p. 83–90, 1972.

ABALIWANO, J. K.; GHEBREMICHAEL, K. A.; AMY, G. L. Application of the purified *Moringa oleifera* coagulant for surface water treatment. **WaterMill**, v. 5, p. 1-19, 2008.

AJZENBERG, D.; BAÑULS, A.L.; SU, C.; DUMÈTRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1185–1196, 2004.

BEAVER, P. C.; C. H. SNYDE.; G. M. CARRERA. Chronic eosinophilia due to visceral larva *migrans*. **Pediatrics**, v. 9, p. 7–19, 1952.

BELLI, SI.; SMITH, N.C.; FERGUSON, D.J.P. The coccidian oocyst: A tough nut to crack! **Trends Parasitology**, v. 22, p. 416–423, 2006.

BEZERRA, A. M. E.; MOMENTÉ, V. G.; MEDEIROS FILHO, S. "Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura brasileira**, v. 22, p. 295-299, 2004.

BHATIA, S.; OTHMAN, Z.; AHMAD, A.L. Pretreatment of palm oil mill effluent (POME) using *Moringa oleifera* seeds as natural coagulant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 145, p. 120-126, 2007.

BLASZKOWSKA J.; KUMATOWSKI P.; DAMIECKA P. Contamination of the soil by eggs of geohelminths in rural areas of Lodz district (Poland). **Helminthologia**, v. 48, p. 67-76, 2011.

BOWIE, W.R.; KING, A.S.; WERKER, D.H.; ISAAC-RENTON, J.L.; BELL, A.; ENG, S.B.; MARION, S.A. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **Lancet**, v. 350, p.173-177, 1997.

BOWMAN, D. D. **Georgis' Parasitology for Veterinarians**. 10th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2014.

CARNEIRO, A.C.; ANDRADE, G.M.; COSTA, J.G.; PINHEIRO, B.V.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; FERREIRA, A.M.; SU, C.; JANUÁRIO, J.N.; VITOR, R.W. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, p. 901-907, 2013

CARVALHO, M. J. H. **Uso de Coagulantes Naturais no Processo de Obtenção de Água Potável**. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2008.

CASEY, T.J. **Unit Treatment Processes in Water and Wastewater Engineering**. 1 ed. Co. Dublin: Wiley, 1997.

CASTILLO, D.; PAREDES, C.; ZAÑARTU, C.; CASTILLO, G.; MERCADO, R.; MUÑOZ, V.; SCHENONE, H. Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs in public squares and parks from Santiago. **Boletín chileno de parasitología**, v. 55, p. 86-91, 2000.

CHEN, C.; CHANG, K.; PAN, T. Monascus purpureus NTU 568 fermented product improves memory and learning ability in rats with aluminium-induced Alzheimer's disease. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 167-177, 2016.

CHIEFFI, P.P.; LESCANO, S.A.Z. **Síndrome de Larvas Migrans Visceral – Toxocaríase**. In: Coura, J.R. (Ed.), **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

CHIEFFI, P.P.; UEDA, M.; CAMARGO, E.D. Contato domiciliar e profissional com cães como fator de risco para infecção humana por larvas de *Toxocara*. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, p. 379-382, 1988.

CHOI, D.; LIM, J.H.; CHOI, D.C.; LEE, K.S.; PAIK, S.W.; KIM, S.H.; CHOI, Y.H.; HUH, S. Transmission of *Toxocara canis* via ingestion of raw cow liver: a cross-sectional study in healthy adults. **Korean Journal Parasitology**, v. 50, p. 23-27, 2012.

CHUANG, P.H.; LEE, C.W.; CHOU, J.Y.; MURUGAN, M.; SHIEH, B.J.; CHEN, H.M. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource technology**, v. 98, p. 232-236, 2007.

COELHO, J.S.; SANTOS, N.D.L.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; FERREIRA, R.S.; ZINGALI, R.B.; COELHO, L.C.B.B.; LEITE, S.P.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAIVA P.M.G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009.

COSTA-CRUZ, J.M.; NUNES, R.S.; BUSO, A.G. Presença de ovos de *Toxocara* spp. em praças públicas da cidade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 36, p. 39-42, 1994.

DE MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, LMG.; WADA, M.Y.; JONES, J.L TUBOI, S.H.; CARMO, E.H.; et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 326-329, 2006.

DEMIREL, E.; KOLÖREN, Z.; KARAMAN, U.; AYZAZ, E. Investigation on *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction and loopmediated isothermal amplification in water samples from Giresun, Turkey. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 48, p. 661-668, 2014.

DESPOMMIER, D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 265-272, 2003.

DUBNÁ, S.; LANGROVÁ, I.; JANKOVSKÁ, I.; VADLEJCH, J.; PEKÁR, S.; NÁPRAVNÍK, J.; FECHTNER, J. Contamination of soil with *Toxocara* eggs in urban (Prague) and rural areas in the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 81-86, 2007.

DUBEY, J.P.; MILLER, N.L.; FRENKEL, J.K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **The Journal of experimental medicine**, v. 132, p. 636-662, 1970.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, p. 42-47, 2006.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. 2 ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p.60-73, 2010.

DUMÈTRE, A.; DARDÉ, M.L. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 651-661, 2003.

DUNN, D; WALLON, M.; PEYRON, F.; PETERSEN, E.; PECKHAM, C.; GILBERT, R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **The Lancet**, v. 353, p. 1829-1833, 1999.

- DUNSMORE, J.D.; THOMPSON, R.C.A.; BATES, I.A. Prevalence and survival of *Toxocara canis* eggs in the urban environment of Perth, Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 16, p. 303–311, 1984.
- FERGUSON, D.J.; BIRCH-ANDERSEN, A.; SIIM, J.C.; HUTCHISON, W.M. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. III. Formation of the sporozoites within the sporocysts. **Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology**, v. 87, p. 253–260, 1979.
- FIALHO, C.G.; TEIXEIRA, M.C.; ARAUJO, F.A.P. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 1-23, 2009.
- FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, New York, v. 6, p. 893-896, 1970.
- FRENKEL, J.K.; Toxoplasmosis: mechanisms of infection. Laboratory diagnosis and management. **Current topics in pathology**, v. 54, p. 27-75, 1971.
- FRITZ, H.M.; BUCHHOLZ, K.R.; CHEN, X.; DURBIN-JOHNSON, B.; ROCKE, D.M.; CONRAD, P.A.; BOOTHROYD, J.C. Transcriptomic analysis of toxoplasma development reveals many novel functions and structures specific to sporozoites and oocysts. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.
- FOREYT, W. J. J. **Veterinary Parasitology – Reference Manual**. 5th ed. Iowa, USA: Wiley-Blackwell, 2001.
- FUNASA, Fundação Nacional de Saúde, **Ministério da Saúde**, Boletim Eletrônico, n. 07, p. 1-3, 2002.
- GILLESPIE, S.H.; DINNING, W.J.; VOLLER, A.; CROWCROFT. The spectrum of ocular toxocariasis. **Eye**, v. 7, p. 415-418, 1993.
- GLICKMAN, L.T.; SCHANTZ, P.M.; CYPRESS, R.H. Canine and human toxocariasis: review of transmission, pathogenesis and clinical disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 175, p. 1265–1269, 1979.
- GLICKMAN, L.T.; SCHANTZ, P.M. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. **Epidemiologic Reviews**, v. 3, p. 230–250, 1981.
- GUIMARÃES, F.N. Toxoplasmose humana Meningoencefalomielite toxoplasmica: Ocorrência em adulto e em recém-nascido. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 3, 1943.
- GRIGG, M.E.; DUBEY, J.P.; NUSSENBLATT, R.B. Ocular Toxoplasmosis: Lessons From Brazil. **American journal of ophthalmology**, v. 159, p. 999-1001, 2015.
- HIGA, L.T.; GARCIA, J.L.; SU, C.; ROSSINI, R.C.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from pregnant women with follow-up of infected children in southern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, p. 244-246, 2014.
- HUTCHISON, W.M.; DUNACHIE, J.F.; WORK, K.; SIIM, J.C. The life cycle of the coccidian parasite *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 380-399, 1971.

JANKU, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of macula lútea in eye of normal dimensions and in microphthalmic eye, with parasites in retina. **Cas Lek Cesk**, v. 62, p.1021-1143, 1923.

JONES, J.L.; DUBEY, J.P. Waterborne toxoplasmosis—recent developments. **Experimental parasitology**, v. 124, p. 10-25, 2010.

JONES, J.L.; SHVACHKO, V.A.; WILKINS, E.E.; BERGEN, R.; MANOS, M.M. Rate of Congenital Toxoplasmosis in Large Integrated Health Care Setting, California, USA, 1998–2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, p. 1573-1574, 2014.

KATAYON, S.; NOOR, M.J.M.M.; ASMA, M.; GHANI, L.A.A.; THAMER, A.M.; AZNI, I.; AHMAD, J.; KHOR, B.C.; SULEYMAN, A.M. Effects of storage conditions of *Moringa oleifera* seeds on its performance in coagulation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1455–1460, 2006.

KAYES, S.G. Human toxocariasis and the visceral larva migrans syndrome: correlative immunopathology. **Chemical Immunology**, v. 66, p. 99–124, 1997.

KRAVETZ, J. Congenital toxoplasmosis. **BMJ Clinical Evidence**, v. 8, p. 1-6, 2013.

LAGO, E.G.; CARVALHO, R.L.; JUNGBLUT, R.; SILVA, V.B.; FIORI, R.M. Screening for *Toxoplasma gondii* antibodies in 2513 consecutive parturient women and evaluation of newborn infants at risk for congenital toxoplasmosis. **Scientia Medica**, v. 19, p. 27–34, 2009.

LEE, A.C.; SCHANTZ, P.M.; KAZACOS, K.R.; MONTGOMERY, S.P.; BOWMAN, D.D. Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. **Trends Parasitology**, v. 26, p. 155–161, 2010.

LIMA, N.M. **Aplicação de *M. oleifera* no tratamento de água com turbidez**. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Pernambuco – Recife, 2015.

MADRONA, G.S.; SERPELLONI, G.B.; VIEIRA, A.M.S.; NISHI, L.; CARDOSO, K.C.; BERGAMASCO, R. Study of the effect of saline solution on the extraction of the *Moringa oleifera* seed's active component for water treatment. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 211, p. 409–415, 2010.

MAHDY, M.A.; ALAREQI, L.M.; ABDUL-GHANI, R.; AL-ERYANI, S.M.; AL-MIKHLAFY, A.A.; AL-MEKHLAFI, A.M.; ALKARSHY, F.; MAHMUD, R. A community-based survey of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in rural areas of Taiz governorate, Yemen: the risk of waterborne transmission. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 13, 2017.

MAI, K.; SHARMAN, P.A.; WALKER, R.A.; KATRIB, M.; DE SOUZA, D.; MCCONVILLE, M.J.; WALLACH, M.G.; BELLI, S.I.; FERGUSON, D.J.; SMITH, N.C. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 281-289, 2009.

MANCUSO, PEDRO C. S.; SANTOS, F. **Reúso da água**. 3 ed. Barueri: Manuelie, 2003.

MANIVANNAN, Y.; MANIVANNAN, B.; BEACH, T.G.; HALDEN, R.U. Role of environmental contaminants in the etiology of Alzheimer's Disease: a Review. **Current Alzheimer Research**, v. 12, p. 116-146, 2015.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging infectious diseases**, v. 5, p. 607-625, 1999.

MONTOYA, J.G.; REMINGTON, J.S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 554-566, 2008.

MORIMATSU, Y.; AKAO, N.; AKIYOSHI, H.; KAWAZU, T.; OKABE, Y.; AIZAWA, H. A familial case of visceral larva migrans after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, p. 303-306, 2006.

NAGAKURA, K.; TACHIBANA, H.; KANEDA, Y.; KATO, Y. Toxocariasis possibly caused by ingesting raw chicken. **Journal Infectious Diseases**, v. 160, p. 735-736, 1989.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus des Seances de L'Academie des Sciences**, v. 148 p. 369-372, 1909.

NISHI, L. **Estudo dos processos de coagulação/floculação seguido de filtração com membranas para remoção de protozoários parasitas e células de cianobactérias**. 2011. 203f. Doctoral Thesis - Universidade Estadual de Maringá – Maringá, 2011.

NKURUNZIZA, T.; NDUWAYEZU, J.B.; BANADDA, E.N, NHAPI, I. The effect of turbidity levels and *Moringa oleifera* concentration on the effectiveness of coagulation in water treatment. **Water science and technology**, v. 59, p. 1551-1558, 2009.

ORÉFICE, F.; FILHO, R.C.; BARBOZA, A.L.; ORÉFICE, J.L.; CALUCCI, D. Toxoplasmose ocular adquirida. Toxoplasmose ocular pós-natal. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 69, p. 184-207, 2010.

OVERGAAUW, P.A. Aspects of Toxocara epidemiology: human toxocariasis. **Critical reviews Microbiol**, v. 23, p. 215-231, 1997.

PALUDO, M.L., FALAVIGNA, D.L.M., ELEFANT, G.R., GOMES, M.L., BAGGIO, M.L.M., AMADEI, L.B., FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Frequency of *Toxocara* infection in children attended by the health public service of Maringá, south Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 343-348, 2007.

PATERNIANI, J.E.S.; RIBEIRO, T.A.P.; MANTOVANI, M.C.; SANT'ANNA, M.R. Water treatment by sedimentation and slow fabric filtration using *Moringa oleifera* seeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 5, p. 1256-1263, 2010.

PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International journal for parasitology**, v. 38, p. 561-69, 2008.

PIZZI, H.L.; RICO, M.; PESSAT, O.A.N. Hallazgo del ciclo ontogenico selvatico del *Toxoplasma gondii* en felidos salvajes (*Oncifelis geofroyi*, *Felis colocolo* y *Felis eird*) de la provincia de Cordoba. **Revista Militar De Remonta E Veterinária**. v. 25, p. 293-300, 1978.

POSSENTI, A.; CHERCHI, S.; BERTUCCINI, L.; POZIO, E.; DUBEY, J.P.; SPANO, F. Molecular characterisation of a novel family of cysteine-rich proteins of *Toxoplasma gondii* and ultrastructural evidence of oocyst wall localisation. **International journal for parasitology**, v. 40, p. 1639–1649, 2010.

POUMAYE, N.; MABINGUI, J.; LUTGEN, P.; BIGAN, M. Contribution to the clarification of surface water from the *Moringa oleifera*: Case M’Poko river to Bangui, Central African Republic. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 90, p. 2346-2352, 2012.

PRADO, A.A.; ALMEIDA, G.F.; GONTIJO, L.S.; TORRES, M.M. Toxoplasmose: o que o profissional da saúde deve saber. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia. v.7, n.12, 2011.

PRITCHARD, M.J.; CRAVEN, T.; MKANDAWIRE, T.; EDMONDSON, A.S; O’NEILL, J.G. A comparison between *Moringa oleifera* and chemical coagulants in the purification of drinking water – An alternative sustainable solution for developing countries. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 35, p. 798-805, 2010.

SANTARÉM, V.A.; SARTOR, I.F.; BERGAMO, F.M.M. Contaminação por ovos de *Toxocara* spp., de parques e praças públicas de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 6, p. 529–532, 1998.

SANTARÉM, V.A.; LELI, F.N.C.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; GIUFFRIDA, R. Protective and risk factors for toxocariasis in children from two different social classes of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, p. 67-72, 2011.

SCHWARTZBROD, J.; BANAS, S. Parasite contamination of liquid sludge from urbanwastewater treatment plants. **Water Science and Technology**, v. 47, p. 163–166. 2003.

SEGUNDO, G.R.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERREIRA, M.S. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. **Journal of tropical pediatrics**, v. 50, p. 50-53, 2004.

SILVEIRA, C.; MUCCIOLI, C.; HOLLAND, G.N.; JONES, J.L.; YU, F.; DE PAULO, A.; BELFORT, R. JR. Ocular Involvement Following an Epidemic of *Toxoplasma gondii* Infection in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. **American journal of ophthalmology**, v. 159, p. 1013-1021, 2015.

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E.S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, p. 131-143, 2010.

SPEER, C.A.; CLARK, S.; DUBEY, J.P. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of parasitology**, v. 84, p. 505–512, 1998.

SPLENDRE, A. Sur un nouveau protozoaire parasite du lapin: deuxième note préliminaire. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v. 2, p.462-465, 1909.

STOICESCU, R.M.; MIHAI, C.M.; GIANNAKOPOULOU, A.D. Marked hypereosinophilia in a toddler: a case report. **Journal Medicine and Life**, v. 4, p. 105–108, 2011.

SU, C.; KHAN, A.; ZHOU, P.; MAJUMDAR, D.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L.; ZHU, X.Q.; AJIOKA J.W.; ROSENTHAL, B.M.; DUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of

distinct ancestral lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 5844–5849, 2012.

TIYO, R.; GUEDES, T.A.; FALAVIGNA, D.L.M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Seasonal contamination of public squares and lawns by parasites with zoonotic potential in Southern Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 82, p. 1–6, 2008.

TORREY, E.F.; YOLKEN, R.H. Toxoplasma oocysts as a public health problem. **Trends Parasitology**, v. 29, p. 380–384, 2013.

VIEIRA, F.P.; ALVES, M.D.; MARTINS, L.M.; RANGEL, A.L.; DUBEY, J.P.; HILL, D.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M. Waterborne toxoplasmosis investigated and analysed under hydrogeological assessment: New data and perspectives for further research. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 929–935, 2015.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. **International Journal of Parasitology**, v. 39, p. 895–901, 2009.

WILDER, H. C. Nematode endophthalmitis. **Transactions - American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology. American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology**, v. 55, p. 99-104, 1950.

WOODHALL, D.; STARR, M.C.; MONTGOMERY, S.P.; JONES, J.L.; LUM, F.; READ, R.W.; MOORTHY, R.S. Ocular toxocariasis: epidemiologic, anatomic, and therapeutic variations based on a survey of ophthalmic subspecialists. **Ophthalmology**, v. 119, p. 1211–1217, 2012.

WON, K.Y.; KRUSZON-MORAN, D.; SCHANTZ, P.M; JONES, J.L. – National seroprevalence and risk factors for zoonotic *Toxocara* spp. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, p. 552-557, 2008.

XINOU, E.; LEFKOPOULOS, A.; GELAGOTI, M.; DREVELEGAS, A.; DIAKOU, A.; MILONAS, I.; DIMITRIADIS, A.S. CT and MR imaging findings in cerebral toxocaral disease. **AJNR. American journal of neuroradiology**, v. 24, p. 714–718, 2003.

YOSHIKAWA, M.; NISHIOFUKU, M.; MORIYA, K.; OUJI, Y.; ISHIZAKA, S.; KASAHARA, K.; MIKASA, K.; HIRAI, T.; MIZUNO, Y.; OGAWA, S.; NAKAMURA, T.; MARUYAMA, H.; AKAO, N. A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. **Parasitology International**, v. 57, p. 525–529, 2008.

YIN, C.Y. Emerging usage of plant-based coagulants for water and wastewater treatment. **Process Biochemistry**, vol. 45, p. 1437–1444, 2010.

CAPÍTULO II

Article: Effect of coagulants *Moringa oleifera* seed extract and aluminum sulfate on *Toxoplasma gondii* oocysts and *Toxocara* spp. eggs in water

Effect of coagulants *Moringa oleifera* seed extract and aluminum sulfate on *Toxoplasma gondii* oocysts and *Toxocara* spp. eggs in water

Lucimara Fátima Beletini¹, Letícia Nishi², Priscilla de Laet Sant'Ana³, Luis Henrique Garcia Muniz⁴, Fernanda Ferreira Evangelista¹, Sérgio Tosi Cardim⁵, João Luis Garcia⁵, Ana Lúcia Falavigna Guilherme³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; ²Departamento de Engenharia Química; ³Departamento de Ciências Básicas da Saúde Universidade Estadual de Maringá; ⁴Diretoria de Análises Clínicas e Farmácia (DAF) – Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM); ⁵Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Ciências Básicas da Saúde (DBS) – av. Colombo 5790 CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

ABSTRACT

This study verified, experimentally, the effect of coagulants *Moringa oleifera* seed extract and aluminum sulfate on *Toxoplasma gondii* oocysts and *Toxocara* spp. eggs, in distilled water (DW) and raw water (RW). Water samples were contaminated (10^6 oocysts) and submitted to the concentration of 50mg/L of each coagulant. For *Toxocara* spp. experiments, 800 eggs/L were used with 10mg/L, 30mg/L and 50mg/L of each coagulant. The supernatant was filtered and centrifugated. *T. gondii* DNA was identified by PCR (kit ReliaPrep™), primers B1 (B22–B23) and Toxo4-5 and quantified by qPCR. For *Toxocara* spp. eggs, after the coagulation and flocculation process, the supernatant was filtered, centrifuged and the eggs were counted in optical microscopy. In the sediment obtained with 50 mg/L of each coagulant was verified the eggs viability. Scanning Electron Microscopy (SEM) was performed to observe oocysts and eggs in each coagulant. *T. gondii* DNA was detected with both coagulants, however, with aluminum sulfate was lower quantity of DNA. Scarce *Toxocara* spp. eggs were found, however in both sediments were found elevated levels of *Toxocara* spp. eggs embrionation. In the SEM images was observed that the coagulants covered the eggs, but with greater adhesion and thicker layer with aluminum sulfate. The residual sediment may be a font of contamination to environment, although aluminum sulfate was able

to reduce the number of oocysts in water. Therefore, these results show the need of better water treatment process to remove or inactivation of these zoonotic parasites from water.

KEYWORDS: *Toxoplasma gondii*, *Toxocara*, Water treatment, Polymerase Chain Reaction, Microscopy Electron Scanning.

INTRODUCTION

Zoonotic parasites can be transmitted directly or indirectly from animals to humans. The protozoan *Toxoplasma gondii* and the nematode *Toxocara* spp. are zoonoses of worldwide distribution (Glickman & Shofer, 1987; Remington et al., 2016). *T. gondii* and *Toxocara cati* use felids as definitive hosts while *Toxocara canis* uses dogs as hosts (Dubey, 2010; Macpherson, 2013; Nijse et al., 2015). Concomitant infection by these zoonoses may be common in humans due to the ingestion of *T. gondii* oocysts and embryonated eggs of *Toxocara* spp. in contaminated water, fruit, vegetables and soil (Jones et al., 2008; Azab et al., 1990; Marchioro et al., 2015; Deuter et al., 2007). *Toxoplasma* infection can also occur through cysts ingested in animal products, or by tachyzoites in transplacental transmission (Dubey, 2010; Santos et al., 2017). Most of the time these zoonoses are asymptomatic (Glickman & Shofer, 1987; Remington et al., 2016), but an important clinical manifestation for both zoonoses is eye disease (Machala et al., 2015). Severe cases of toxoplasmosis are observed in immunocompromised individuals (Machala et al., 2015) and when fetal infection occurs during pregnancy (Kravetz, 2013; Higa et al., 2014; Remington, 2016; Sanders et al., 2017) resulting in severe neurological and ocular disorders to the fetus (Torrey and Yolken, 2013). The human becomes infected postnatally by ingesting oocysts and cysts of *T. gondii* (Montoya, 2004; Torrey and Yolken, 2013).

The migration of *Toxocara* infective larvae through human tissues, after the ingestion of embryonated eggs, does not result in severe clinical manifestations in most cases (Glickman & Shofer, 1987; Taylor et al., 1987). However, high parasitic loads or repeated infection can cause fever, hepatomegaly, splenomegaly, respiratory symptoms, muscle pain, ocular damage and eosinophilia (Macpherson, 2013). The use of groundwater for drinking or cooking without adequate water treatment or sanitation can increase the risk of infection in individuals who consume it (Laine et al., 2011). Waterborne protozoan parasite infections represent a public health risk in both developed and developing countries (Baldursson and Karanis, 2011; Efstratiou et al., 2017; Karanis et al., 2007; Moura et al., 2006). Oocysts of *T. gondii* are resistant to most disinfectants agents including chlorinated agents normally used in water treatment plants (WTP) (Payment and Locas, 2011; Rudko et al., 2017). On the other hand, the helminths from the Ascarididae family, as the *Toxocara* genus have eggs with thick coat that gives them the ability to withstand environmental adversities (Glickman and Schantz, 1981). The purpose of drinking water purification is to reduce or eliminate numerous impurities, including pathogens, organic matter and chemical elements. One of the stages consists of coagulation and flocculation which facilitate the removal by conventional physical treatment

like sedimentation or filtration of particles that are colloidal (Koohestanian et al., 2008). Inorganic coagulants and/or polymers are typically used during the water treatment process to remove suspended solids, bacteria and viruses. Iron and aluminum salts are widely used for this purpose in coagulation/flocculation process, since they are low cost products and effectiveness in removing impurities of water (Henderson et al., 2009; Jarvis et al., 2012). However, it presents some drawbacks as a residual trace of metals in the treated water, which can cause undesirable damages to the individuals, mainly to the central nervous system, as well as the environment, to accumulate high sludge production in the water treatment plant (WTP) (Yang et al., 2011; Wang et al., 2010; Rondeau et al., 2009; Pritchard et al., 2010). Alternative treatments with natural coagulants can bring some advantages such as being biodegradable, non-toxic, and with less sludge production (Salazar-Gamez et al., 2015; Moraes, 2004). One of the natural coagulants employed is the *Moringa oleifera* Lam seed extract (Jahn, 1981; Pritchard et al., 2010). Laboratory studies have demonstrated success of these seed extracts in the removal of bacteria, algae and intestinal protozoa *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in the aquatic environment (Franco, 2010; Paterniani et al., 2010; Nishi, 2011). However, there are no experiments with *T. gondii*, as well as evolutionary parasite forms such as helminth eggs, which have higher mass and higher sedimentation capacity. Therefore, the aim of this study was to verify, experimentally, the effect of coagulants *M. oleifera* seed extract and aluminum sulfate on *T. gondii* oocysts and *Toxocara* spp. eggs in water.

MATERIAL AND METHODS

Water samples

Two different types of water were used in the experiment. One of them consisted of distilled water (DW) and the another was raw water (RW) obtained from Pirapó River, with an initial turbidity of 50 NTU, collected at the treatment plant located in the City of Maringá, Paraná State, South Brazil. Initially, 1000 mL of water samples were analyzed for the presence of *T. gondii* or *Toxocara* spp. through the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, primers B1 e Toxo4-5, and formalin-ethyl acetate sedimentation, followed by microscopy, respectively, to ensure that the samples were free of the parasites as described later.

A volume of 1000 mL of each water sample was used to coagulation/flocculation/sedimentation process.

Oocysts of *T. gondii*

Sporulated oocysts of ME-49 strain of *T. gondii* were used, obtained from Medical Veterinary Department of State University of Londrina, Paraná State, Brazil. The samples of raw water and distilled water were contaminated with 10^6 oocysts in 1000 mL, before the coagulant addition.

Eggs of *Toxocara* spp.

Fresh feces samples of dog infected with *Toxocara* spp. were prepared and the obtained eggs were counted in optical microscopy an average of 800 eggs was added on each water sample (1000mL). About 95% of the eggs were not embryonated.

Preparation of coagulants

Mature seeds of *M. oleifera* were previously removed from the pod and air dried. At the day of the experiments, the seed pulp was crushed and a concentration of 1% weight /volume (w/v) was prepared adding 1g of the powder in 100mL of distilled water, agitated for 30 min and vacuum filtered in qualitative paper (Madrona et al., 2010). The 1% standard solution of the chemical coagulant was prepared by dissolving 10.3g of aluminum sulfate powder (97% purity) in distilled water and the volume was completed to 1000 mL (Valverde et al., 2013).

Coagulation/flocculation process (CF process)

For each type of water (DW and RW), the tests were performed with 10^6 /L oocysts of *T. gondii*, at the concentration of 50mg/L of *M. oleifera* and aluminum sulfate (Nishi, 2011; Valverde et al., 2013).

For *Toxocara* spp. experiments 800 eggs/L were added in the two types of water (DW and RW) and the CF process was performed with 10mg/L, 30mg/L and 50mg/L of each coagulant.

Experimental tests were conducted in jar test equipment Nova Ética-Model 218 LDB with six samples run simultaneously in beakers of 2000 mL capacity. Water temperature was maintained at $25.0 \pm 3.0^\circ\text{C}$ in all experiments (Nishi, 2011).

The experimental conditions for the CF process to *M. oleifera* were rapid mixing velocity (100rpm), rapid mixing time (3 min), slow mixing velocity (15 rpm), slow mixing time (15 min) and settling time (60 min) (Madrona et al., 2010). To aluminum sulfate, the experimental conditions for the CF process were rapid mixing velocity (100rpm), rapid mixing

time (2 min and 30 seconds), slow mixing velocity (15 rpm), slow mixing time (20 min) and settling time (20 min) (Konradt-Moraes, 2009).

For the process control, water samples were submitted to the same conditions of the processes without addition of any coagulant solution. After coagulation/flocculation and sedimentation process, samples were further analysed on turbidity parameters and the presence of *T. gondii* oocysts and *Toxocara* spp. eggs as follows.

Turbidity

The nephelometric method is based in light intensity comparison by reference standard suspension. The turbidity measure was determined in Policontrol turbidimeter, AP2000 model, using formazin standard solutions with results expressed in Nephelometric Turbidity Units (NTU), according to Standard Methods (Eaton et al., 2005)

Membrane filtered, mechanic extraction and elution

After settling time, the supernatant from each water sample was gently aspirated until a volume of approximately 150 mL of sediment left. Then, filtered in cellulose ester membrane (47mm diameter, 0,3µm pore size, Millipore) using a negative pressure vacuum pump (10-15mmHg). The membranes were than manually scraped as described by Franco (2009). The obtained material was centrifugated at 2500 rpm for 10 minutes to concentrated the material to a final volume of 1ml and stored in microtubes at 4°C.

T. gondii DNA identification and quantification by qPCR

A 150 µL sample was taken from the final volume of each sample and frozen in liquid nitrogen (-196°C) for 5 min, followed by thawing in a dry bath at 65°C for 5 min. This cycle was repeated five times (Marchioro et al., 2016). Extraction was performed using a commercial kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega, USA), following the manufacturer's recommendations. The samples were analyzed by PCR using the primers B1 (B22–B23) to amplify 115 base pairs (bp) (Burg et al, 1989) and Toxo4–5 to amplify a fragment of 529 bp (Homan et al., 2000). In each reaction, a negative control (mixture without DNA) and a positive control (DNA extracted from Me-49 strain) were processed. The amplified products were observed on 4.5% polyacrylamide gels, revealed by silver, and digitally recorded.

The qPCR amplification was performed following methodology described by Opsteegh et al., (2011). The parasite load of each sample was quantified using the StepOne™Plus Real Time PCR System (Life Technologies, USA) and the Taqman System (Life Technologies,

USA). Specific primers Tox9F and Tox11R were used to target a product of 162 bp. For each sample, PCR mixture contained 12.5µL TaqMan®Universal PCR MasterMix (Life Technologies, USA), 0.7µM of each primer, 0.05µM of Probe, BSA (10µg/ml), 2µL of template and ultrapure water in a final solution of 25µL. All PCR reactions were performed in duplicate and carried out as follows: initial denaturation at 95°C for 10 minutes, 45 cycles at 95°C for 10 s, 58°C for 20 s and 72°C for 20 s. Fluorescence was measured at the end of each cycle for quantification of the amount of *T. gondii* DNA in the samples, a standard curve was constructed based on DNA concentration. Considering that this methodology was developed for tachyzoites genotype B1 with 35 genome copies (Burg et al, 1989), each result obtained in the amplification of the samples was multiplied by eight, and thus given in number of sporulated oocysts (eight sporozoites) (Dubey et al., 1970; Dubey et al., 1998).

Toxocara spp. eggs analysis

After the CF process of each sample, the supernatant was centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes and reduced to 1 mL volume and were counted by optical microscopy.

Toxocara spp. eggs viability after coagulants treatment

The sediment obtained after CF process (150 mL) was removed from the jar and kept at temperature 28-30°C, for 20 days to check the viability of *Toxocara* eggs. From each sample, 200 eggs were counted and their viability measured in percentage, observing the embryonation using an optical microscopy. In the control, the eggs were left in water, without addition of coagulants. The experiment was performed in triplicate and the arithmetic mean of the count was obtained.

Scanning Electron Microscopy of *T. gondii* oocysts and *Toxocara* spp. Eggs.

A Shimadzu SS 550 Superscan scanning electron microscope (Shimadzu, Japan) was additionally used to examine the morphological characteristics of the *T. gondii* oocysts and *Toxocara* spp. eggs. The samples of *T. gondii* oocysts were fixed in Karnovsky's fixative prior to being dehydrated, critical point dried, mounted and metal coated (Rostgaard and Christensen, 1975) at a voltage of 20 kV after the water samples treatment with *M. oleifera* extract and aluminum sulfate. This experiment was performed with 50 mg/L of each coagulant in distilled water.

Statistical analysis

The obtained data were entered in a spreadsheet of the program Microsoft Excel 2010 and analyzed statistically with the aid of the Software Statistica Single User version 13.2. The mean, standard deviation, maximum, minimum of the evaluated variables were calculated. The non-parametric Mann-Whitney test was used to compare the two groups. The level of significance adopted in the tests was 5%, that is, comparisons with $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

T. gondii DNA were detected in DW and RW after treatment with natural or chemical coagulants (Table 1). There was a high rate of *T. gondii* DNA (oocysts) (94,5%) in RW after using aluminum sulfate, compared to *M. oleifera* (69,5%) or control samples (without coagulant) (Table 1). Both coagulants were not able to reduce expressive DNA level (oocysts) in DW (Table 1). No differences were observed in deposition of the coagulants on the oocysts visualized by scanning electron microscopy (Figure 1).

It was found scarce eggs of *Toxocara* spp. in samples submitted to coagulation process using aluminum sulfate or *M. oleifera* seed, in both types of water (Table 2) even without statistical difference in the use of coagulants. High levels of embrionation of *Toxacara* sp. eggs occurred in sediment obtained from both coagulants (Table 2). No free larvae were observed in sediment treated with aluminum sulfate at 30 and 50 mg/L (Table 2). In scanning electron microscopy was noted that the eggs in the sediment were coated with the coagulants, but greater adhesion and thicker layer was observed with the aluminum sulfate (Figure 1).

There was a significant reduction in turbidity values in the RW samples submitted to the coagulation process using aluminum sulphate when compared to *M. oleifera* and control (Table 1 and Table 2).

Table 1. Water experimentally contaminated with 10^6 *Toxoplasma gondii* oocysts submitted to coagulation/flocculation process using 50 mg/L of *Moringa oleifera* seed extract and 50 mg/L of aluminum sulfate.

Variables	N	PCR	Turbidity	qPCR (n° oocysts/L) Mean \pm Standard deviation		P value
<i>Moringa oleifera</i>						
DW	30	+	1.3	473,128.0 ^c	\pm 224,608.7	0.3655
DW (control)	30	+	1.2	408,654.0	\pm 185,990.2	
RW	30	+	13.9	120,626.9 ^{c, d,}	\pm 40,277.0	0.0818
RW (Control)	30	+	18.2	396,624.0	\pm 430,251.1	
Aluminum sulfate						
DW	30	+	1.1	406,816.2 ^a	\pm 297,286.7	0.6065
DW (control)	30	+	1.2	408,654	\pm 185,990.2	
RW	30	+	2.1	21,211.2 ^{a, b, d,}	\pm 42,867.8	0.0001
RW (control)	30	+	24.1	396,624 ^b	\pm 430,251.1	

Letters (a, b, c, d) in the table identify different statistically significant $p < 0,05$.

DW= destiled water; RW= raw water

Table 2. Results obtained in samples of water contaminated by *Toxocara* spp. after the coagulation and flocculation process (CF) with *Moringa oleifera* and aluminum sulfate.

<i>M. oleifera</i> **	Type of water	Eggs/L after CF	Count of 200 eggs after being kept in DW and CF for 20 days, 25-30°C			Turbidity (NTU)*
			Embryonated eggs	Non-embryonated Eggs	Larvae	
10 mg/L	DW	1.2	190	4	6	17.0
	RW	0				
30 mg/L	DW	2.8	157	32	11	15.4
	RW	0				
50 mg/L	DW	0	161	27	12	13.9
	RW	0				
Aluminum Sulfate**						
10 mg/L	DW	2.8	184	12	4	14.5
	RW	4.0				
30 mg/L	DW	13.2	177	23	0	3.2
	RW	4.0				
50 mg/L	DW	4.0	179	21	0	2.1
	RW	0				
Control						
	DW	5.2	172	17	11	18.2
	RW	4.0				

*Samples of RW with initial turbidity of 50 NTU.

DW= destiled water RW= raw water

** No statistical difference $p > 0,05$.

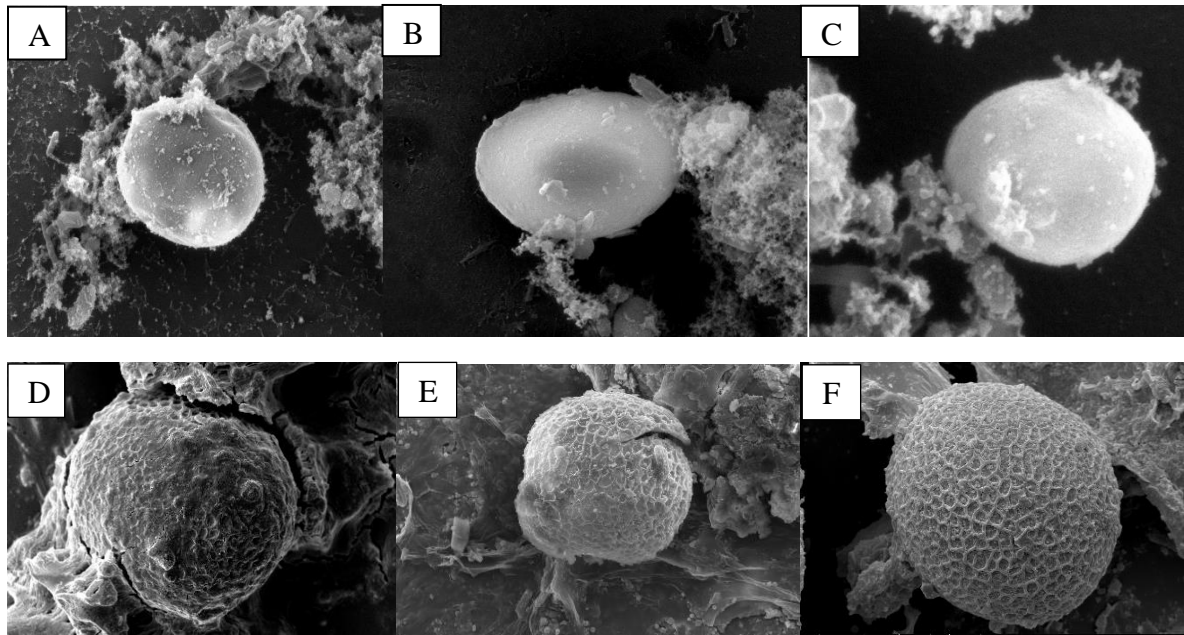


Figure 1. Scanning Electron Microscopy of *Toxoplasma gondii* oocysts and *Toxocara* spp. eggs after coagulation and flocculation process with 50 mg/L of coagulation in distilled water. *T. gondii* – (A) Aluminium sulfate (10,321x), (B) *Moringa oleifera* (10,378x), (C) control (10,222x); *Toxocara* spp. – (D) Aluminium sulfate (3,536x), (E) *Moringa oleifera* (2,691x), (F) control (3,668x).

DISCUSSION

The use of natural or chemical coagulant to treat raw or distilled water did not prevent the detection of *T. gondii* DNA. However, in raw water, aluminum sulfate was more effective in removal of oocysts even in a shorter period of time when compared to the natural coagulant. There was a reduction rate of *T. gondii* oocysts of 94.5% after the use of the chemical coagulant, agreeing with the study of Keegan et al. (2008), which obtained a reduction of 95.9 - 97.2% of removal of oocysts of *Cryptosporidium parvum* using 40 mg / L of aluminum sulfate. While the reduction of *T. gondii* oocysts using *Moringa oleifera* was 69.5%. This fact could be explained by the formation of heavier flocs with the coagulant aluminum sulfate and the organic matter of RW, including the *T. gondii* oocysts, these flocs are larger and heavier than those formed with *M.oleifera* and sediment more quickly and contributed to better sedimentation of the parasite structure (Bongiovani et al., 2014). Although dirt makes difficult to extract DNA, it may, on the other hand, facilitate the deposition of evolutive forms by chemical binding of the particles. An example, distilled water samples both coagulants did not reduce the quantity of oocysts recovered. The variations in the amount of DNA observed for the different samples can be attributed to numerous challenges in recovering *T. gondii* oocysts in the environment,

including the aquatic environment (Dumètre and Dardé, 2003). Although the infectious dose for most warm-blooded animals is unknown, some intermediate hosts, including mice and pigs, are highly susceptible and become infected at doses as low as 1-10 *T. gondii* oocysts (Rejmanek et al., 2010).

It was observed agreement between reduction of turbidity and oocysts found in the water after coagulation/flocculation process with aluminum sulfate, in agreement with another papers that used oocysts of *Cryptosporidium* spp. and cysts of *Giardia* spp. (Karanis et al., 2007; Nishi et al., 2012). The same wasn't confirmed in relation to coagulant *M. oleifera* agreeing with other studies (Sengupta et al., 2012; Dorea, 2006) that also used low turbidity water (<50 NTU). However, Petersen et al., (2016) and Nishi et al., (2012), observed oocyst reduction of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. cysts, using concentrations of 150 mg/L of *M. oleifera* seed extract. High concentrations were not tested in the present study because they did not simulate what is normally occurs in the water treatment plant. However, higher concentrations of *M. oleifera* may be useful for improving water quality, such as for irrigation (Petersen et al., 2016).

It was expected high sedimentation rate of *Toxocara* spp. eggs in the experiments. This fact was observed in all samples, since they are structures with high density. Sengupta et al., (2011) also observed a higher egg sedimentation rate of *Ascaris suum* when compared to *Trichuris* and *Oesophagostomum* eggs. This fact can be explained due to the nipple membrane of the *Ascaris* eggs that facilitates the deposition of particle flakes and consequently a higher settlement velocity than the eggs of *Trichuris* and *Oesophagostomum* that present smooth membrane. Therefore, rare *Toxocara* spp. eggs remained in the water, after the coagulation processes was performed. A thicker layer was observed with aluminum sulfate, however, this did not influence the viability of the eggs. Ki-Seok et al., (2016), demonstrated that the treatment of eggs of *Ascaris suum* with many commercially available disinfectants does not affect the embryonation. The residue left in the environment by the water treatment plants may favor the infection of humans and animals susceptible to *Toxocara* spp. Etewa et al., (2016), observed higher quantity of *Toxocara* spp. in soil samples with 20% of humidity and presence of organic matter. However, even without statistical significance, the absence of free live larvae in the sediment after using of aluminum sulfate may pose a greater risk of infection, since the larvae must remain inside the egg to be infective. Aluminum sulfate was capable to reduce, but not eliminate *T. gondii* oocysts from raw water, while *M. oleifera* seed extract show poor effect in the concentrations tested. Both coagulants, in different concentrations did not influenced the sedimentation of *Toxocara* spp. eggs, because they are heavy structures, as well as, did not

influenced its viability left in the sediment for 20 days. Therefore, these results show the need of better water treatment process to remove or inactivation of these zoonotic parasites from water.

ACKNOWLEDGMENTS

This study has been financially supported by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel). The authors also thanks COMCAP - UEM for their help in scanning electron microscopy. And teacher Rosangela Bergamasco from LGCPA – UEM.

REFERENCES

- Azab, M.E., Safar, E.H., Khattab, H.M., 1990. Concomitant *Toxoplasma* and *Toxocara* infections. **J. Egypt Public Health Assoc.** 65 (3-4), 253-261.
- Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004–2010. **Water Res.** 45 (20), 6603–6614.
- Bongiovani, M.C., Camacho, F.P., Nishi, L., Coldebella, P.F., Valverde, K.C., Vieira, A.M., Bergamasco, R., 2014. Improvement of the coagulation/flocculation process using a combination of *Moringa oleifera* Lam with anionic polymer in water treatment. **Environ Technol.** 35(17-20), 2227-2236.
- Burg, J.L., Grover, C.M., Pouletty, P., Boothroyd, J.C., 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **J. Clin Microbiol.** 27 (8), 1787-1792.
- Deuter, C.M.E., Garweg, J.G., Pleyer, U., Schçnherr, U., Thurau, S. 2007. Ocular toxoplasmosis and toxocariasis in childhood. **Klin. Monbl. Augenheilkd.** 224 (6), 483-487.
- Dorea, C.C., 2006. Use of *Moringa* spp. seeds for coagulation: a review of a sustainable option. **Water Science and Technology: Water Supply.** 6 (1), 219-227.
- Dubey, J.P., miller, N.L., Frenkel, J.K. 1970. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 157 (11), 1767-1770.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A. 1998. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. **Clin. Microbiol. Rev.** 11 (2), 267–299.
- Dubey, J. P. Review of “Toxoplasmosis of Animals and Humans (Second Edition)” by J.P. Dubey. 2010. **Parasit. Vectors.** 3, 112.
- Dumètre, A., Dardé, M.L. 2003. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? **FEMS Microbiol. Rev.** 27 (5), 651-661.

Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., Franson, M.A.H. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th ed. Washington, DC. Centennial Edition, 2005.

Etewa, S.E., Abdel-Rahman, S.A., Abd El-Aal, N.F., Fathy, G.M., EL-Shafey, M.A., Ewis, A.M. 2016. Geohelminths distribution as affected by soil properties, physicochemical factors and climate in Sharkya governorate Egypt. **J. Parasit. Dis.** 40 (2), 496-504.

Efstratiou, A., Ongerth, J.E., Karanis, P. 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2011 e 2016. **Water Res.** 114, 14–22.

Franco, M. **Uso de coagulante extraído de sementes de *Moringa oleifera* como auxiliar no tratamento de água por filtração em múltiplas etapas**. 2010. 90 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

Franco, E.S. **Avaliação da influência dos coagulantes sulfato de alumínio e cloreto férrico na remoção de turbidez e cor da água bruta e sua relação com sólidos na geração de lodo em estações de tratamento de água**. 2009. 207 p. Dissertação (Mestrado)) – Universidade Federal de Ouro Preto, 2009.

Glickman, L.T., Schantz, P.M. 1981. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. **Epidemiol. Rev.** 3, 230-250.

Glickman, L.T. & Shofer, F.S. 1987. Zoonotic visceral and ocular larva *Migrans*. **Vet. Clin. Nort. Am.: Small Animal Practice.** 17 (1), 39–53.

Henderson, J.L., Raucher, R.S., Weicksel, S., OXenford, J., Mangravite, F. 2009. Supply of Critical Drinking Water and Wastewater Treatment Chemicals—A White Paper for Understanding Recent Chemical Price Increases and Shortages-4225. **Water Res. Foun.** Denver, CO.

Higa, L.T., Garcia, J.L., Su, C., Rossini, T.C., Falavigna-Guilherme, A.L. 2014. *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from pregnant women with follow-up of infected children in southern Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 108 (4), 244-246.

Homan, W.L.; Vercammenb, M.; De Braekeleer, J.; Verschueren, H. 2000. Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **Int. J. Parasitol.** 30 (1), 69-75.

Jahn S. A. A. **Traditional water purification in developing countries: Existing methods and potential application**. v. 117. Eschborn. German Agency for Technical Cooperation (GTZ), 1981.

Jarvis, P., Sharp, E., Pidou, M., Molinder, R., Parsons, S.A., Jefferson, B. 2012. Comparison of coagulation performance and floc properties using a novel zirconium coagulant against traditional ferric and alum coagulants. **Water Res.** 46 (13), 4179–4187.

Jones, J.L., Kruszon-Moran, D., Won, K., Wilson, M., Schantz, P.M. 2008. *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp. co-infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 78 (1), 35–39.

Karanis, P., Kourenti, C., Smith, H. 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **J. Water Health.** 5 (1), 1–38.

Keegan, A., Daminato, D., Saint, C.P., Monis, P.T. 2008. Effect of water treatment processes on *Cryptosporidium* infectivity. **Water Research**. 42, 1805-1811.

Ki-Seok, O., Geon-Tae, K., Kyu-Sung, A., Sung-Shik, S. 2016. Effects of Disinfectants on Larval Development of *Ascaris suum* Eggs. **Korean J. Parasitol**. 54 (1), 103-107.

Kravetz, J. Congenital toxoplasmosis. **BMJ Clin. Evid**. 2013, 2013.

Konradt-Moraes, L. C. **Estudo dos Processos de coagulação e floculação seguidos de filtração com membranas para a obtenção de água potável**. 2009. 192 f. Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, Brasil, 2009.

Koohestanian, A., Hosseini, M., Abbasian, Z. 2008. The Separation Method for Removing of Colloidal Particles from Raw Water. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci**. 4 (2), 266-273.

Laine, J., Huovinen, E., Virtanen, M.J., Snellman, M., Lumio, J., Ruutu, P., Kujansuu, E., Vuento, R., Pitkänen, T., Miettinen, I., Herrala, J., Lepistö, O., Antonen, J., Helenius J., Hänninen, M.L., Maunula, L., Mustonen, J., Kuusi, M., 2011. An extensive gastroenteritis outbreak after drinking-water contamination by sewage effluent, Finland. **Epidemiol. Infect**. 139 (7), 1105–1113.

Machala, L., Kodym, M., Maly, M., Geleneky, M., Beran, O., Jilich, D. 2015. [Toxoplasmosis in immunocompromised patients]. **Epidemiol. Mikrobiol. Imunol**. 64 (2), 59-65.

Macpherson, C.N.L. 2013. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. **Int. J. Parasitol**. 43 (12-13), 999-1008.

Madrona, G.S.; Serpelloni, G.B.; Vieira, A.M.S.; Nishi, L.; Cardoso, K.C.; Bergamasco, R. 2010. Study of the effect of saline solution on the extraction of the *Moringa oleifera* seed's active component for water treatment. **Water, Air, Soil, Poll**. 211 (1), 409–415.

Marchioro, A.A., Colli, C.M., Ferreira, E.C., Viol, B.M., Araujo, S.M., Falavigna-Guilherme, A.L. 2015. Risk factors associated with toxoplasmosis and toxocariasis in populations of children from nine cities in southern Brazil. **J. Helminthol**. 89 (4), 428-432.

Marchioro, A.A., Tiyo, B.T., Colli, C.M., De Souza, C.Z., Garcia, J.L., Gomes, M.L., Falavigna-Guilherme, A.L. 2016. First Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the Fresh Leafs of Vegetables in South America. **Vector Borne Zoonotic Dis**. 16 (9), 624-626.

Montoya, J.G., Liesenfeld, O. 2004. Toxoplasmosis. **Lancet**. 363 (9425), 1965-1976.

Moraes, L. C. K. **Estudo da coagulação-ultrafiltração com o biopolímero quitosana para a produção de água potável**, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá. 2004.

Moura, L., Bahia-Oliveira, L.M.G., Wada, M.Y., Jones, J.L., Tuboi, S.H., Carmo, E.H., Ramalho, W.M., Camargo, N.J., Trevisan, R., Graça, R.M., da Silva, A.J., Moura, I., Dubey, J.P., Garrett, D.O. 2006. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerg. Infect. Dis**. 12 (2), 326-29.

Nishi, L. **Estudo dos processos de coagulação/floculação seguido de filtração com membranas para remoção de protozoários parasitas e células de cianobactérias**. 2011. 203f. Doctoral Thesis - Universidade Estadual de Maringá – Maringá, 2011.

Nishi, L., Vieira, A.M.S., Vieira, M.F., Silva, G.F., Bergamasco, R. 2012. Application of Hybrid Process of Coagulation/Flocculation and Membrane Filtration for the Removal of Protozoan Parasites from Water. **Procedia Engineering**, 42, 148-160.

Nijse, R., Mughini-Gras, L., Wagenaar, J.A., Franssen, F., Ploeger, H.W. 2015. Environmental contamination with *Toxocara* eggs: a quantitative approach to estimate the relative contributions of dogs, cats and foxes, and to assess the efficacy of advised interventions in dogs. **Parasites Vectors**, 8, 397.

Opsteegh, M., Prickaerts, S., Frankena, K., Evers, E. G. 2011. A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. **Int. J. Food Microbiol.** 150 (2-3), 103–114.

Payment, P.; Locas, A. 2011. Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. **Ground water**. 49 (1) 4-11.

Paterniani, J.E.S., Ribeiro, T.A.P., Mantovani, M.C., Sant’Anna. 2010. Water treatment by sedimentation and slow fabric filtration using *Moringa oleifera* seeds. **Afric. J. Agric. Res.** 5 (11), 1256-1263.

Petersen, H.H., Petersen, T.B., Enemark, H.L., Olsen, A., Dalsgaard, A. 2016. Removal of *Cryptosporidium parvum* oocysts in low quality water using *Moringa oleifera* seed extract as coagulant. **Food and Waterb. Parasitol.** 3, 1-8.

Pritchard, M.J., Craven, T., Mkandawire, T., Edmondson, A.S., O’Neill, J.G. 2010. A comparison between *Moringa oleifera* and chemical coagulants in the purification of drinking water – An alternative sustainable solution for developing countries. **Phys. and Chem. the Earth.** 35 (13-14), 798-805.

Rejmanek-D.; Vanwormer, E.; Mazet, J.A.; Packham, A.E.; Aguilar, B.; Conrad, P.A. 2010. Congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) after oral oocyst infection. **J. Parasitol.** 96 (3), 516–520.

Remington J. S. et al. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn**. Eight Edition. Saunders, 2016.

Rondeau, V., Jacqmin-Gadda, H., Commenges, D., Helmer, C., Dartigues, J-F. 2009. Aluminium and silica in drinking water and the risk of Alzheimer’s disease or cognitive decline: Findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort. **Am. J. Epidemiol.** 169 (4), 489–496.

Rudko, S.P., Ruecker, N.J., Ashbolt, N.J., Neumann, N.F., Hanington, P.C. 2017. *Enterobius vermicularis* as a Novel Surrogate for the Presence of Helminth Ova in Tertiary Wastewater Treatment Plants. **Appl. Environ. Microbiol.** 83 (11).

Salazar Gámez, L.L., Luna-Delrisco, M., Cano, R.E. 2015. Comparative study between *M. oleifera* and aluminum sulfate for water treatment: case study Colombia. **Environ. Monit. Assess.** 187 (10), 668.

- Sanders, A.P., Dos Santos, T., Felipe, C.K.K., Estevão, M.L., Cícero, C., Evangelista, F., MANRIQUE, C.A., Mizutani, A.S., Falavigna-Guilherme, A.L. 2017. Ocular Lesions in Congenital Toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Paraná, Brazil. **Pediatr. Infect. Dis J.** 36 (9), 817-820.
- Santos, P.C., Telmo, P.L., Lehmann, L.M., Mattos, G.T., Klafke, G.B., Lorenzi, C., Hirsch, C., Lemos, L., Berne, M.E.A., Gonçalves, C.V., Scaini, C.J. 2017. Risk and other factors associated with toxoplasmosis and toxocariasis in pregnant women from southern Brazil. **J. Helminthol.** 91 (5), 534-538.
- Sengupta, M.E., Thamsborg, S.M., Andersen, T.J., Olsen, A. Sedimentation of helminth eggs in water. 2011. **Water Research.** 45, 4651-4660.
- Sengupta, M.E., Keraita, B., Olsen, A., Boateng, O.K., Thamsborg, S.M., Pálsdóttir, G.R Dalsgaard, A. 2012. Use of *Moringa oleifera* seed extracts to reduce helminth egg numbers and turbidity in irrigation water. **Water Research.** 46, 3646-3656.
- Taylor, M.R., Keane, C.T., O'connor, P., Girdwood, R.W., Smith, H. 1987. Clinical features of covert toxocariasis. **Scand. J. Infect. Dis.** 19 (6), 693–696.
- Valverde, K.C, Moraes, L.C.K., Bongiovani, M.C., Camacho, F.P., Bergamasco, R. 2013. Coagulation diagrams using the *Moringa oleifera* Lam and the aluminium sulphate, aiming the removal of color and turbidity of water. **Ac. Scie.** 35, 485–489.
- Torrey, E.F.; Yolken, R.H. 2013. Toxoplasma oocysts as a public health problem. **Trends Parasitol.** 29, 380-384.
- Wang, W.; Yang, H.; wang, X.; Jiang, J.; zhu, W. 2010. Effects of fulvic acid and humic acid on aluminum speciation in drinking water. **J. environ sci.** 22 (2), 211–217.
- Yang, Z., Gao, B., Wang, Y., Wang, Q., Yue, Q. 2011. Aluminum fractions in surface water from reservoirs by coagulation treatment with polyaluminum chloride (PAC): Influence of initial pH and $\text{OH}^- / \text{Al}^{3+}$ ratio. **Chem. Engin. J.** 170 (1), 107–113.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

1. Detecção de DNA de *T. gondii* em todas as amostras de água, destilada ou água bruta, após a utilização dos coagulantes sulfato de alumínio e *M. oleifera*.
2. Houve redução significativa de oocistos na água bruta após o tratamento com sulfato de alumínio.
3. O sulfato de alumínio reduziu a turbidez da água em níveis recomendados pela legislação, havendo concordância entre redução da turbidez e diminuição de oocistos de *T. gondii*.
4. *M. oleifera* não foi capaz de reduzir a quantidade de oocistos de *T. gondii*, na concentração de 50 mg/L.
5. Escassos ovos de *Toxocara* spp. foram encontrados em qualquer tipo de água após os processos de coagulação e floculação e não interferiram na viabilidade dos ovos.
6. Espessa camada de sulfato de alumínio foi observado ao redor dos ovos de *Toxocara* spp. e foram os que apresentaram menor quantidade de larvas livres, conseqüentemente, manteve os ovos infectantes.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Avaliar possíveis efeitos da *M. oleifera* em outras formas evolutivas de *T. gondii*, como a realização de testes *in vitro* na forma de taquizoítas, uma vez que essa planta tem apresentado várias atividades sobre patógenos.

Testar outras frações de *M. oleifera*, bem como outras formulações de coagulantes para a remoção de oocistos de *T. gondii* em água, além de buscar a inviabilidade sobre formas evolutivas de *T. gondii* e *Toxocara* spp.

Utilizar nanopartículas em frações naturais ou químicas de coagulantes.

Avaliar tanto coagulantes químicos como naturais, modificados com nanopartículas a fim de auxiliar na remoção destes parasitos.