

Análises parasitológicas de olerícolas produzidas no Norte de Minas Gerais

Parasitological analysis of vegetables produced in the North of Minas Gerais

Rafael Ramos Lages Bento¹

Lucinéia de Pinho²

Rafael Jorge de Almeida Rodrigues³

Dayane Sandrely Rodrigues Mesquita⁴

Anna Christina de Almeida⁵

Resumo: Embora as hortaliças sejam amplamente comercializadas e consumidas no Brasil, a ingestão de verduras cruas constitui um importante meio de transmissão de parasitoses intestinais. **Objetivo:** O presente estudo teve por objetivo avaliar a presença de parasitas em olerícolas produzidas no Norte de Minas Gerais. **Metodologia:** Avaliaram-se oito espécies de olerícolas (espinafre, couve, brócolis, cebolinha, chuchu, quiabo, tomate e pimentão), no período de novembro a dezembro de 2009. As hortaliças *in natura* foram lavadas e a água da lavagem analisada pelo método de sedimentação por 12 a 24 horas. **Resultados:** A análise parasitológica detectou parasitas intestinais em 100% das amostras analisadas. Observou-se a presença de cistos de *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*, ovos de *Ascaris lumbricoides* e Ancilostomídeos, larvas de *Strongyloides stercoralis*, Ancilostomídeos e protozoários ciliados semelhantes à *Balantidium coli*. A maioria desses organismos é de importância para saúde pública por apresentarem patogenicidade ao homem. **Conclusão:** Esses resultados indicam que as olerícolas produzidas na região não apresentam padrão de qualidade higiênico-sanitária, o que salienta a necessidade de maior orientação aos produtores, manipuladores e consumidores quanto à correta manipulação e higienização das hortaliças, o que reduziria doenças parasitárias veiculadas por alimentos.

Palavras-Chave: Segurança alimentar. Olerícolas. Parasitas intestinais.

Abstract: Although vegetables are highly marketed and consumed in Brazil, the ingestion of raw vegetables is an important route for intestinal parasite transmission. **Objective:** This study aimed the analysis of the occurrence of parasites in vegetables produced in the north of the state of Minas Gerais. **Methods:** Eight vegetable species (spinach, kale, broccoli, chives, chayote, okra, tomatoes and peppers) were evaluated from November to December 2009. The fresh vegetables were washed and the washing water was analyzed by the sedimentation method for 12 to 24 hours. **Results:** The parasitological analysis detected intestinal parasites in 100% of the samples analyzed. The samples contained cysts of *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*, eggs of *Ascaris lumbricoides* and hookworms, larvae of *Strongyloides stercoralis*, hookworms and ciliated protozoan similar to *Balantidium coli*. Most of these organisms are of public health concern due to their pathogenicity. **Conclusions:** These results indicate that the vegetables produced in the region do not reach the standards of sanitary quality required, which stresses the lack of orientation to the producer, food handlers and consumers in which concerns proper manipulation and sanitation of vegetables, which could decrease foodborne parasitic diseases.

Keywords: Food safety. Vegetables. Intestinal parasites.

1 Especialista em Análises Clínicas e Citologia Esfoliativa - Colpocitologia.

2 Doutoranda em Ciências da Saúde - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes.

3 Graduado em Agronomia - Universidade Estadual de Montes Claros - UFMG.

4 Graduanda em Nutrição - Faculdade de Saúde Ibituruna - FASI.

5 Doutorado em Ciência Animal - Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais - ICA/UFMG

INTRODUÇÃO

O homem está sujeito a contrair várias doenças em função do consumo de alimentos contaminados. Cerca de 250 doenças podem ser veiculadas ao homem por alimentos.¹ Apesar da evolução dos conhecimentos sobre os microrganismos, dos mecanismos de intoxicações e infecções e das técnicas de higienização de alimentos, surtos e casos de doenças de origem alimentar ainda são frequentes.²

As doenças transmitidas por alimentos podem ser resultantes das más condições sanitárias na produção, armazenamento, transporte e manuseio dos alimentos. É o caso das olerícolas, consideradas um dos principais veículos de parasitoses intestinais, amplamente difundidas na população.³

As olerícolas, principalmente aquelas consumidas “*in natura*”, podem representar vias de transmissão de parasitas uma vez que, no Brasil, esses alimentos frequentemente são adubados com dejetos animais ou irrigados com águas contaminadas com matéria fecal de origem humana e/ou animal. O consumo extradomiciliar de refeições rápidas e pré-preparadas, a falta de higiene dos manipuladores de alimentos e o crescimento populacional desordenado nos grandes centros urbanos também são fatores que aumentam a incidência de infecções por parasitas intestinais.⁴

Assim, parasitas causadores de variadas doenças podem tornar os alimentos insalubres. Em algumas regiões geográficas, esses organismos podem inclusive tornar-se mais relevantes que as bactérias. De fato, os parasitas são, em geral, mais resistentes a condições ambientais adversas do que bactérias patogênicas ao homem, representando, portanto maior potencial de risco à segurança do alimento.⁵

As parasitoses intestinais representam um problema de grande importância em saúde pública devido à sua alta prevalência e diversidade de manifestações clínicas. Isso é agravado no Brasil uma vez que aproximadamente um terço da população vive em condições ambientais propícias à disseminação das infecções parasitárias.⁶⁻⁷

Os agentes mais comuns de entoparasitoses são os protozoários *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*, os helmintos *Ascaris lumbricoides*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, ancilostomídeos, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermicularis* e *Schistosoma mansoni*.¹¹ De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que mais de 900 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *Ascaris lumbricoides*, 900 milhões por ancilostomídeos e cerca de 500 milhões por *Trichuris trichiura*.⁸ As informações sobre a prevalência de helmintos e protozoários intestinais no Brasil são escassas ou mesmo nulas para determinadas regiões. Quando existe, esta informação é fragmentada e desatualizada, e como as técnicas parasitológicas utilizadas nos diferentes estudos não são coincidentes, não é possível comparar os dados.⁹

As enteroparasitoses causam, principalmente em crianças, má-absorção dos alimentos, diarreia crônica, anemia, desnutrição, dores abdominais e depauperamento físico e mental, resultando em baixo rendimento escolar, retardamento no crescimento e na mentalidade dos indivíduos acometidos.¹⁰

Na cadeia de transmissão das enteroparasitoses, as fezes representam o veículo e a fonte de contaminação de todos os parasitas. Desse modo, o solo, o ar, a água, as moscas, as mãos e os alimentos (incluindo as verduras) são elementos essenciais da cadeia epidemiológica. Uma vez que a manipulação de alimentos em condições precárias de higiene também é um fator importante na transmissão de enteroparasitas¹³⁻¹⁴, o diagnóstico laboratorial de protozoários e helmintos parasitas em olerícolas é de grande importância. Esse diagnóstico fornece dados sobre as condições higiênico-sanitárias envolvidas na cadeia de produção desses alimentos, permitindo assim estimar os riscos de contaminação de consumidores.¹²

O monitoramento da contaminação fecal ambiental por meio da pesquisa de parasitas intestinais em olerícolas fornece dados para Vigilância Sanitária sobre as condições higiênico-sanitárias desses produtos e permite difundir informações para prevenção da

contaminação entre manipuladores de alimentos e produtores, promovendo a segurança alimentar.¹⁵

Nesse sentido, o presente estudo analisou a presença de parasitas em olerícolas (espinafre, couve, brócolis, cebolinha, chuchu, quiabo, tomate e pimentão) produzidas no Norte de Minas Gerais. Embora a olericultura seja uma atividade difundida nessa região, a atividade consiste, em grande parte, de agricultura familiar, com procedimentos rudimentares de manejo agrícola e de manipulação dos alimentos produzidos.

MATERIAL E MÉTODOS

As atividades de campo e análises laboratoriais foram realizadas durante os meses de novembro e dezembro de 2009. Foram utilizadas 40 amostras de olerícolas produzidas no Norte de Minas Gerais pela Associação dos Produtores Hortifrutigranjeiros da Região do Pentáurea (ASPROHPEN), sendo cinco de cada espécie: espinafre, couve, brócolis, cebolinha, chuchu, quiabo, tomate e pimentão. A ASPROHPEN, localizada 25 quilômetros da cidade de Montes Claros, abrange 13 comunidades rurais. A associação conta com 190 associados e produz cerca de 150.000 kg de alimento por mês. A ASPROHPEN tem parceria o Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG) que desenvolve o programa “Apoio a agricultores familiares do Norte de Minas Gerais em atividade de produção, higiene e saúde pública”.

As olerícolas foram coletadas aleatoriamente no período da manhã e acondicionadas individualmente em sacos de polietileno de baixa densidade limpos e descartáveis. Depois de identificadas, as amostras foram colocadas em caixas de isopor e posteriormente analisadas no Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Saúde de Ibituruna, Montes Claros, MG.

Tomando como base Oliveira & Germano⁴ (1992), usou-se 150g de cada planta por réplica. A análise das amostras foi realizada de acordo com o método descrito por Craig¹⁶ adaptado, como descrito a seguir.

Utilizando luvas cirúrgicas, os vegetais foram desfolhados e higienizados em recipientes plásticos com 150 mL de água deionizada. O processo de lavagem dos alimentos deu-se pelo atrito da luva com a superfície dos mesmos. Logo após, as olerícolas foram erguidas para escorrer completamente a água e em seguida desprezadas. O líquido obtido foi filtrado por um funil analítico com filtro de gaze e recolhido em um cálice de sedimentação. A bandeja plástica que continha as olerícolas foi lavada duas vezes com 25mL de água deionizada, recolhendo-se o líquido no próprio cálice de sedimentação. O filtrado ficou em repouso de 12 a 24 horas.

Completada a sedimentação no cálice, com uma pipeta Pasteur transferiu-se 5mL do sedimento para um tubo de centrifugação. As amostras de sedimento foram centrifugadas com velocidade angular média 1500 rpm por 2 minutos. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e ajustou-se o volume final do sedimento para 0,5mL com água destilada, homogeneizando a solução com o auxílio de um bastão.

Com uma micropipeta graduada, colocou-se 0,05mL do sedimento em uma lâmina corada com solução de lugol e o mesmo volume em uma lâmina sem corante. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (aumento de 100x e 400x) para identificação, confirmação e quantificação de estruturas parasitárias (cistos, ovos e larvas). Foram analisadas 80 lâminas, 10 para cada hortaliça e 2 para cada amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 5 amostras de cada uma das 8 olerícolas pesquisadas continham algum tipo de estrutura parasitária, isto é, 100% das amostras estavam contaminadas. Isso revela um alto nível de contaminação. Observou-se a presença de cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos, dentre eles: cistos de *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*, ovos de *Ascaris lumbricoides* e Ancilostomídeos, larvas de *Strongyloides stercoralis* e

Tabela 1: Estruturas parasitárias identificadas nas espécies de olerícolas produzidas em Montes Claros, Norte de Minas Gerais, 2009

PLANTA	CISTOS			OVOS		LARVAS		*Protoz. Ciliados
	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. lumbricoideis</i>	Ancilostomídeo	<i>S. stercoralis</i>	Ancilostomídeo	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
espinafre	1(3%)	-	2(7%)	-	-	-	9(31%)	17(59%)
couve	-	-	1(3%)	1(3%)	-	2(6%)	9(28%)	20(60%)
brócolis	-	1(4%)	2(8%)	-	-	3(12%)	5(18%)	15(58%)
cebolinha	-	1(6.6%)	-	-	1(6.6%)	1(6.6%)	-	12(80%)
chuchu	-	-	1(5%)	-	-	1(5%)	3(15%)	15(75%)
quiabo	-	-	-	-	-	-	1(14%)	6(86%)
tomate	-	1(5%)	1(5%)	-	15%	2(10%)	2(10%)	13(65%)
pimentão	-	-	1(11%)	1(11%)	-	1(11%)	-	6(67%)

* Estruturas similares a *Balantidium coli*

Ancilostomídeos e protozoários ciliados semelhantes à *Balantidium coli* (Tabela 1). Essas espécies estão entre os enteroparasitas mais comuns¹¹, mas a prevalência absoluta que apresentaram é um resultado alarmante.

O consumo de olerícolas está associado a uma série de benefícios à saúde, com implicações diretas na melhoria da qualidade de vida da população. Por isso, há um estímulo para que esses alimentos sejam consumidos, sobretudo *in natura*, o que possibilita a exposição de uma grande parcela da população às formas transmissíveis de parasitas.¹⁷ Assim, após análise dos resultados considera-se que as olerícolas pesquisadas podem apresentar um papel importante na transmissão de enteroparasitoses para a população, dado que são amplamente consumidas na região.

Pelos resultados apresentados na figura 1, observa-se que do total de 159 enteroparasitas encontrados, as formas mais frequentes foram os

protozoários ciliados, com 66% (104/159), enquanto as formas císticas de *Entamoeba coli* (5%, 8/159) e *Giardia lamblia* (2%, 3/159) foram menos frequentes. A presença de protozoários ciliados nas hortaliças é indicativa de contaminação fecal de origem humana, e ou, animal, decorrente da água utilizada para a irrigação ou do manejo impróprio no cultivo dessas hortaliças.¹⁸ Além disso, a presença desses organismos em hortaliças sugere um alto risco de infecção uma vez que eles co-existem com outras estruturas parasitárias para o homem.¹⁹ No presente estudo, as formas ciliadas mais encontradas se assemelhavam a *Balantidium coli*. Esse protozoário é o único ciliado capaz de provocar doenças em humanos, e embora a ocorrência de *B. coli* no intestino grosso não seja capaz de desencadear balantidiose, há evidências de que, em circunstâncias como na redução da defesa imunológica, ele deixa de ser comensal e passa a ser um verdadeiro parasito.²⁰

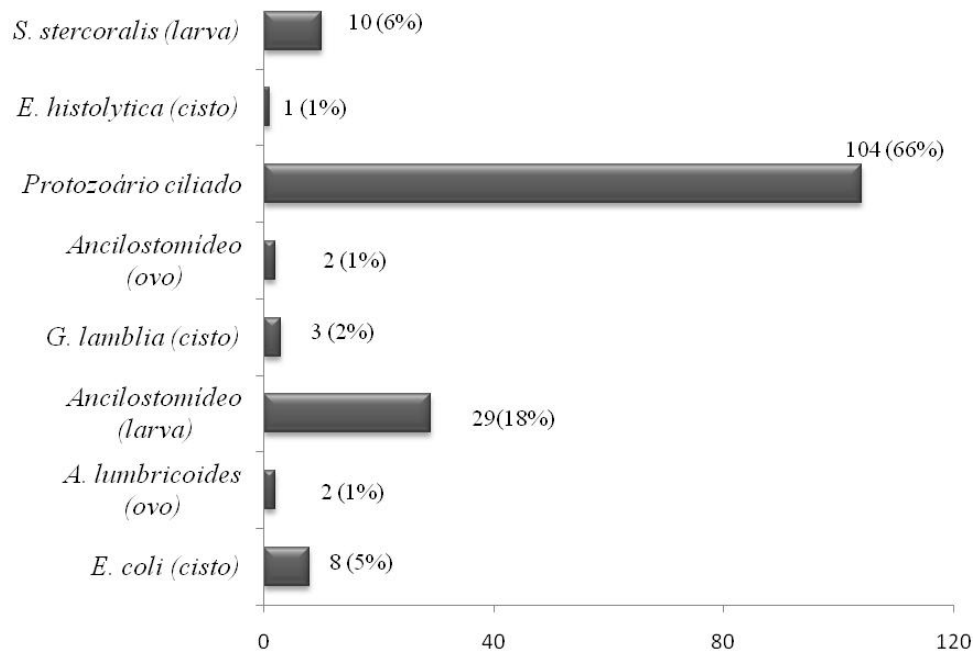


Figura 1: Percentual total das estruturas parasitárias identificadas nas olerícolas produzidas em Montes Claros, Norte de Minas Gerais, 2009.

A viabilidade e a quantidade de cistos e ovos de parasitos e/ou comensais intestinais, que podem ser eliminados no meio e veiculados pelas mãos, são as principais preocupações em relação à transmissão. Mas apesar da baixa prevalência de formas císticas de *G. lamblia* e *E. coli*, a ocorrência de cistos desses organismos deve ser avaliada com atenção. *G. lamblia* se encontra dentre os protozoários mais frequentes transmitidos pela manipulação de alimentos^{21,22}, e em função da sua patogenicidade, a simples presença desse parasita já é um alerta para a saúde pública.

Dentre os helmintos, a maior incidência foi das larvas de Ancilostomídeos, com 18% (29/159), seguido das larvas de *Strongyloides stercoralis*, com 6% (10/159). Esses helmintos são de grande importância em Saúde Pública, não só pela alta prevalência, mas pela diversidade de manifestações clínicas que geram em seus hospedeiros.²³

Outros autores já reportaram 100% de contaminação de alface na região de Montes Claros²⁴

por entoparasitas. Ampliando-se essa análise para outras olerícolas, o presente estudo indica que também o espinafre, couve, brócolis, cebolinha, chuchu, quiabo, tomate e pimentão sofrem carregam enteroparasitas. Isso reforça o baixo padrão higiênico em algumas das etapas do manejo das olerícolas de agricultores familiares cooperados na região de Montes Claros. É interessante notar que o percentual de enteroparasitas encontrado em outras regiões do país é mais baixo. Por exemplo, Takayanagui *et al.*²⁵ (2001), constatou a presença de parasitas intestinais em 53% (20/38) das amostras de alface que avaliaram em Ribeirão Preto, SP; Guilherme *et al.*²⁶ (1999) observou apenas 6,6% (2/30) de enteroparasitas em alfaces crespas em Maringá, PR, e Coelho *et al.*²⁷ (2001) detectou 3,9% (42/1080) em hortaliças avaliadas em Sorocaba, SP. As divergências em relação às prevalências das formas enteroparasitárias são provavelmente relacionada aos locais de estudo. O controle parasitário é mais efetivo quando o produtor conta com certa infraestrutura,

melhorando as condições de saneamento básico e, conseqüentemente, a higiene das hortaliças cultivadas.

Outro fator a ser considerado é a qualidade da água utilizada para irrigação das hortaliças pelos agricultores associados à ASPROHPEN. A falta de saneamento básico em propriedades rurais da região deve facilitar a contaminação das fontes de água usada para cultivo e irrigação de hortaliças com fezes de animais e até humanas. Além da água, a precariedade de higiene para o transporte, armazenamento e manipulação das hortaliças deve promover a disseminação de cistos, ovos e larvas de enteroparasitas.

Os resultados obtidos ressaltam a necessidade da conscientização dos agricultores de Montes Claros no sentido de se adequarem às boas práticas do cultivo de olerícolas e, conseqüentemente, assegurarem a qualidade microbiológica das mesmas. Assim, ações diretas como educação sanitária, diagnóstico parasitológico periódico e tecnologia sustentável na produção de olerícolas possibilitaria melhoria das condições higiênico-sanitárias de produção e manipulação de alimentos.

CONCLUSÃO

As hortaliças cultivadas na região de Montes Claros apresentaram 100% de contaminação por enteroparasitas, sendo 66% protozoários ciliados, 18% larvas de Ancilostomídeos, 6% larvas de *Strongyloides stercoralis*, 5% cistos de *Entamoeba coli* e 2% cistos de *Giardia lamblia*.

As olerícolas analisadas apresentaram baixa qualidade higiênico-sanitária tornando necessária a orientação de procedimentos adequados na produção e manipulação desses produtos que venham a minimizar a transmissão de doenças de origem parasitária veiculada por alimentos.

Este trabalho teve apoio financeiro do MEC/SESu/ProExt e FAPEMIG- APQ 07371-07.

REFERÊNCIAS

1. CDC. *Centers for Disease Control and Prevention Summary of notifiable diseases—United States, 2004*. MMWR, 2006.
2. ANDRADE, N. J. *Higiene na Indústria de Alimentos*. São Paulo: Varela, 2008, 412p.
3. SLIFKO, T.R. *et al.* Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal Parasitology*, v. 30, p. 1389-1393, 2000.
4. OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO, P.M.L. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na Região Metropolitana de São Paulo - SP, Brasil. I - Pesquisa de helmintos. *Revista de Saúde Pública*, v. 26, p. 283-289, 1992a.
5. PESSOA, S. B. *Parasitologia médica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1972.
6. MUNIZ, R.C.; QUEIROZ, M.I. Relação entre desnutrição energético-protéica vitamina A, e parasitoses em crianças vivendo em Brasília. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, p. 133-42, 2002.
7. FERREIRA, P. *et al.* Ocorrência de parasitas e comensais intestinais em crianças de escola localizada em assentamento de sem-terra em Campo Florido, Minas Gerais, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 109-11, 2003.
8. BASSO, R. M. C. *et al.* Evolução da prevalência de parasitoses intestinais em escolares em Caxias do Sul, RS. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 3, p. 263-268, 2008.

9. CARVALHO, O.S. *et al.* Prevalência de helmintos intestinais em três mesorregiões do Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 6, 2002.
10. PITTNER, E. *et al.* Enteroparasitoses em crianças de uma comunidade escolar na cidade de Guarapuava, PR. *Revista Salus*, 2007.
11. NEVES, David Pereira. *Parasitologia Humana*. 11. Ed. São Paulo: editora Atheneu, 2005.
12. GELLI, D.S. *et al.* Condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na Cidade de São Paulo, SP, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 39, p. 37-43, 1979.
13. PUPULIM, N.R.T. *et al.* Uma tentativa de orientar comunidades escolares no controle de parasitoses. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 28, p. 130-3, 1996.
14. COULTER, J.B.S. Global importance of parasitic disease. *Current Pediatrics*, v. 12. n. 7, p. 523-33, 2002.
15. SOARES, B.; CANTOS, G.A. Qualidade parasitológica e condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 8, n. 4, p. 377-384, 2005.
16. LIMA, A.O. *et al.* Métodos de laboratório aplicados à clínica. 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. 699p.
17. CANTOS, G.A. *et al.* Estruturas parasitárias encontradas em hortaliças comercializadas em Florianópolis. *Revista NewsLab*, v. 66, p. 154-63, 2004.
18. ALMEIDA FILHO, P.C. *Avaliação das condições ambientais e higiênico-sanitárias na produção de hortaliças folhosas no núcleo hortícola suburbano de Vargem Bonita, Distrito Federal*. Dissertação (Mestrado em Planejamento e Gestão Ambiental). Universidade Católica de Brasília, Brasília. 103 p., 2008.
19. MESQUITA, V.C.C. *et al.* Contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.34, n.4, p.189-194, 1999.
20. GRACZYK T.K. *et al.* The association of Blastocystis hominis and Endolimax nana with diarrheal stools in Zambian school-age children. *Parasitology Research*, v. 98, p. 38-43, 2005.
21. SILVA, L. P. *et al.* Diagnóstico parasitológico de horticultores no monitoramento da contaminação parasitária em ambientes rurais. *Bioscience Journal*, v. 26, n. 4, p. 648-652, 2010.
22. SOUSA, M.R.P. *et al.* Helmintoses com relevância em saúde pública, transmissíveis através de água e dos alimentos. *Higiene Alimentar*, v. 15, n. 6, p. 19-24, 2001.
23. GRILLO, L.P. *et al.* Influência das condições sócio-econômicas nas alterações nutricionais e na taxa de metabolismo de repouso em crianças escolares moradoras em favelas do município de São Paulo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.46, n.1, p.7-14, 2000.
24. FERREIRA, L.M. *et al.* *Avaliação parasitológica em alface (lactuca sativa) comercializadas em Montes Claros/MG, Brasil*. Disponível em: <<https://sistemas.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=3022&numeroEdicao=18>>. Acesso: 22 fev. 2011.
25. TAKAYANAGUI, O.M. *et al.* Fiscalização de verduras do município de Ribeirão Preto, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2001.

26. GUILHERME, A.L.F. *et al.* Prevalência de enteroparasitas em horticultores e hortaliças da Feira do Produtor de Maringá, Paraná. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n. 4, p. 405-411, 1999.

27. COELHO, L.P.S, *et al.* Detecção de formas transmissíveis de enteroparasitas na água e nas hortaliças consumidas em comunidades escolares de Sorocaba, São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* , v.34, n.5, p. 479-482, 2001.