

Resíduos do beneficiamento do camarão cultivado: obtenção de pigmentos carotenóides

Waste from the processing of farmed shrimp: a source of carotenoid pigments

Masayoshi OGAWA^{1*}, Everardo Lima MAIA¹, Ana Carolina FERNANDES², Maria Lucia NUNES³,
Maria Elisabeth Barros de OLIVEIRA⁴, Simone Tupinambá FREITAS⁵

Resumo

A extração de pigmentos carotenóides constitui uma possível alternativa, de grande agregação de valor, para o aproveitamento da cabeça do camarão *Litopenaeus vannamei*. O objetivo do presente trabalho foi a identificação, a extração e a quantificação dos principais pigmentos desta matéria-prima, coletados a partir de uma planta de beneficiamento de camarão no Ceará - Brasil. Após cocção dos resíduos a 100 °C, na proporção 1:2 cabeça de camarão e água durante 15 minutos, obteve-se uma pasta de pigmentos brutos extraído-se os carotenóides com acetona resfriada e, posteriormente, com hexano, obtendo a fase pigmento-hexano. Obteve-se também a fase DMSO, após o material ser particionado com dimetilsulfóxido, e uma fração acidificada. Estas frações sofreram evaporação e secagem, sendo os carotenóides identificados em coluna aberta, utilizando-se o parâmetro de eluição das frações, o espectro de absorção visível e o valor de R_f na camada delgada de sílica gel. Os espectros de absorção de cada fração foram obtidos a 350 a 550 nm e quantificados por cromatografia de camada delgada. Para o cálculo de carotenóides totais (37,62 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ da pasta de pigmentos), utilizou-se o somatório das frações hexano, DMSO e acidificada, e coeficientes de extinção 2592, 2100 e 1690 referentes ao β -caroteno, astaxantina e astaceno, respectivamente. A astaxantina foi o pigmento mais abundante (45,5%), seguido do β -caroteno-5,6-epóxido (33,5%) e do astaceno (21,0%).

Palavras-chave: resíduos; camarão; pigmentos carotenóides; astaxantina.

Abstract

The extraction of carotenoid pigments from shrimp heads left over from the processing of *Litopenaeus vannamei* has been shown to constitute an economically feasible alternative for aggregating value to shrimp processing waste. The objective of the present study was to extract, identify and quantify the main pigments found in shrimp heads collected at a shrimp processing plant in Ceará (Brazil). Samples were cooked for 15 minutes at 100 °C in water at a ratio of 1:2 until producing a mush. Carotenoids were extracted using cooled acetone and then hexane (the hexane phase). Subsequently, the DMSO phase was produced along with an acid fraction by partitioning with dimethyl sulfoxide. Following evaporation and drying, the carotenoids were identified in an open column using the elution parameter of the fractions, the visible absorption spectrum and the R_f value of the thin layer of silica gel. The absorption spectra of each fraction were read at 350-550 nm and quantified by thin-layer chromatography. The calculation of total carotenoids (37.62 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of the pigment mush) used the sum of the hexane, DMSO and acid fractions as well as the extinction coefficients of β -carotene, astaxantin and astacin (2592, 2100 and 1690, respectively). The most abundant pigment was astaxantin (45.5%), followed by β -carotene-5,6-epoxide (33.5%) and astacin (21.0%).

Keywords: processing waste; shrimp; carotenoid pigments; astaxantin.

1 Introdução

Os carotenóides são pigmentos naturais e solúveis em gordura, encontrados principalmente em plantas, algas, bactérias fotossintéticas e em microorganismos não fotossintéticos como fungos e leveduras. Em salmão, truta arco-íris e nos crustáceos (camarão, lagosta e caranguejo), sendo a astaxantina o carotenóide encontrado em maior abundância²⁵.

No cultivo de peixes como a tilápia vermelha e de crustáceos, a astaxantina é comumente adicionada à ração animal para compensar a falta da ocorrência natural deste pigmento²⁹. Além de promover a pigmentação, o crescimento e a sobrevivência dos animais cultivados²⁸, este pigmento também estimula o sistema imunológico de trutas. No entanto, o estímulo não é

suficiente para que a astaxantina seja incluída como um agente imuno-estimulante nas formulações alimentares²⁶.

A cabeça de camarão, com baixíssimo valor comercial, é uma fonte de poluição ambiental, além de gerar custos adicionais durante seu descarte, reduzindo a margem de lucro do sistema de produção. Nos últimos três anos, o Brasil produziu aproximadamente 50.000 t de camarão descabeçado. No caso específico do *L. vannamei*, o cefalotórax constitui aproximadamente 33%, dependendo do tamanho dos animais¹⁴, os quais geralmente continuam sendo descartados pelas unidades beneficiadoras, sem qualquer tipo de aproveitamento tecnológico. Vale ressaltar que os resíduos de crustáceos, dependendo da espécie e do processamento, podem chegar a atingir 85% do peso inicial¹⁹.

Muitos estudos foram realizados quanto ao aproveitamento destes resíduos, sob diversas formas, a saber: farinha de camarão¹⁵; elaboração de produtos flavorizantes^{2,12,17} e quitina e quitosana^{16,8}. Uma possível alternativa de grande agregação de valor para este material é a sua utilização para extração de pigmentos carotenóides, por existir potencial e demanda pelas indústrias de alimentos, farmacêutica e de ração. Deste

Recebido para publicação em 3/7/2006

Aceito para publicação em 23/4/2007 (001782)

¹ Laboratório de Recursos Aquáticos - LARAq, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará - UFC, Av Mister Hull, s/n, CEP 60356000, Fortaleza - CE, Brasil, E-mail: ogawa@ufc.br

² Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará - UFC, MSc Kraft do Brasil

³ Universidade Federal de Sergipe - UFS

⁴ CNPAT/Embrapa

⁵ Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará - UFC

*A quem a correspondência deve ser enviada

modo, o presente trabalho objetiva investigar a presença dos principais pigmentos carotenóides encontrados no cefalotórax do camarão cultivado *L. vannamei*.

2 Material e métodos

2.1 Extração por cocção dos pigmentos da cabeça de camarões

As cabeças de camarão, *Litopenaeus vannamei*, foram obtidas em plantas de beneficiamento de crustáceos de Fortaleza, ainda no estado fresco, sendo imediatamente conduzidas ao Laboratório de Recursos Aquáticos (LARAq) do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. Através de um processo de cocção a 100 °C durante 15 minutos (proporção 1:2 camarão e água), obteve-se uma pasta avermelhada contendo os pigmentos carotenóides brutos, que após acondicionamento em vidro revestido com papel alumínio foi estocada em freezer até o início das análises.

2.2 Análise de pigmentos carotenóides

O procedimento utilizado para análise dos pigmentos carotenóides foi realizado de acordo com as recomendações de BRITTON et al⁵, envolvendo as etapas de extração, saponificação, separação e quantificação dos carotenóides, conforme descrição abaixo:

Extração

Os pigmentos carotenóides foram extraídos de 30 g de pasta, obtida segundo descrito em 2.1, através de homogeneização com acetona resfriada (60 mL) em liqüidificador. A mistura foi filtrada sob vácuo de trompa d'água em kitasato e funil de Büchner, munido com papel de filtro comercial de filtração rápida. O resíduo foi lavado com acetona até o filtrado apresentar-se incolor.

A solução aceto-pigmentada foi transferida para um funil de separação, onde foram adicionados 150 mL de hexano. Após separação das duas fases, a camada inferior contendo acetona foi descartada e a fase hexânica, contendo os pigmentos, foi mantida no funil e repetidamente lavada com água destilada, para remoção completa da acetona. A água residual foi removida através de filtração com sulfato de sódio anidro. O volume final do extrato de pigmento total em hexano foi completado para 350 mL pela adição do solvente.

Partição hexano/dimetilsulfóxido (DMSO)

Os pigmentos brutos presentes no extrato de hexano foram particionados em funil de separação, usando 350 mL de DMSO e obtendo-se as fases epifásica (pigmentos em hexano) e hipofásica (pigmentos em DMSO). Após separação, a fase hexano foi lavada com água destilada até alcançar uma coloração laranja-claro, sempre adicionando pequenas porções de etanol para evitar a emulsificação da mesma. A solução foi filtrada em sulfato de sódio anidro, para retirada completa da água, foi concentrada em evaporador rotatório sob vácuo a 35 °C e estocada em freezer.

Os carotenóides presentes na fase DMSO foram purificados pela adição de água destilada (150 mL), NaCl saturado (70 mL) e etanol (225 mL). A solução foi agitada, resfriada em banho de gelo e extraída com uma mistura de éter etílico e hexano (1:1), até ausência de cor. A fração DMSO foi lavada com água destilada e filtrada em sulfato de sódio anidro, seguindo-se de evaporação em evaporador rotativo, sob pressão reduzida e estocada em freezer.

Saponificação da fração hexano e obtenção da fração acidificada

A fração hexano foi dissolvida em 150 mL de éter etílico e 250 mL de 5% KOH em etanol a 90%, sendo então deixada em repouso por duas horas à temperatura ambiente e sob ausência de luz. Em seguida, adicionou-se água destilada (375 mL) e extração com 200 mL da mistura éter etílico e hexano (1:1), resultando nas fases hexano e aquosa. A fase hexano foi então lavada até pH ligeiramente ácido (pH \pm 5), filtrada em sulfato de sódio anidro, evaporada sob vácuo em evaporador rotativo (35 °C) e estocada em freezer. A camada aquosa foi acidificada com ácido acético (pH:4) e submetida à nova extração com a mistura éter etílico e hexano. Procedeu-se nova lavagem em água destilada, filtração em sulfato de sódio anidro, evaporação sob vácuo em evaporador rotativo a 35 °C e estocagem em freezer.

Cromatografia em coluna aberta

A separação de pigmentos das frações hexano e DMSO foi realizada em colunas de vidro com 2 cm de diâmetro, contendo pequena quantidade de fibra de algodão na sua parte inferior, seguida de sílica gel 60 até uma altura de 11 cm e sulfato de sódio anidro na parte superior da coluna, para absorção de possíveis resíduos de água contidos na amostra. Procedeu-se a cromatografia, inicialmente, com hexano e éter etílico a 20%, com aumento gradativo das concentrações de éter etílico, mantendo-se um gradiente de polaridade. A eluição foi concluída usando-se metanol puro.

Identificação dos carotenóides

Os carotenóides foram identificados pelo comportamento de eluição das frações na coluna, o espectro de absorção visível e o valor de R_f em camada delgada de sílica gel. Os espectros de absorção dos pigmentos em hexano foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 350 a 550 nm, em espectrofotômetro (UV-VIS Varian Cary).

A placa de sílica gel foi desenvolvida numa cuba saturada, com fase móvel constituída de benzeno, éter e acetona, na proporção de 10:2, 5:2, respectivamente. Após desenvolvimento, calculou-se os valores de R_f, para em seguida, submeter a placa a vapores de HCl em uma cuba saturada, visando detectar a presença de grupos epóxidos.

Quantificação dos carotenóides

Os pigmentos foram quantificados através do uso da fórmula mostrada abaixo³:

$$\frac{\mu\text{g de carotenóide}}{\text{g de amostra}} = \frac{\text{absorbância} \cdot \text{vol. da solução} \cdot 10^6}{100 \cdot E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot \text{peso da amostra}} \quad (1)$$

Os valores dos coeficientes de extinção $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ utilizados para quantificação dos carotenóides foram descritos por BRITTON⁴, sendo de 2592 (hexano), 2100 (hexano) e 1690 (piridina), respectivamente, para β -caroteno-5,6-epóxido, astaxantina e astaceno.

3 Resultados e discussão

3.1 Identificação dos pigmentos carotenóides

A cromatografia em coluna da fração hexano revelou a presença de cinco bandas, todas variando entre as tonalidades de amarelo fraco a forte. O principal pigmento (coloração amarelo forte) foi eluído com o gradiente inicial de solventes (20% de éter etílico em hexano). Da mesma maneira, o principal pigmento da fração DMSO (cinco bandas com colorações variando entre amarelo claro a laranja muito forte) foi o da terceira fração (coloração laranja muito forte) eluída da coluna com 50% de éter etílico em hexano.

Os resultados sobre a análise espectrofotométrica e cromatografia em camada delgada dos principais pigmentos das frações hexano e DMSO, bem como da fração acidificada de cabeça de camarão *L. vannamei*, estão mostrados na Tabela 1.

Os dados apresentados para a fração hexano permitem, experimentalmente, identificar o pigmento como sendo o β -caroteno-5,6-epóxido (Figura 1). De acordo com RODRIGUEZ-AMAYA²³, este composto deve apresentar espectro de absorvância ligeiramente inferior ao do β -caroteno, eluir na coluna aberta após o β -caroteno e ocorrer mudança da cor, amarelo para azul esverdeado, quando submetido a vapores de HCl, significando que o pigmento apresenta em sua estrutura radical epóxido.

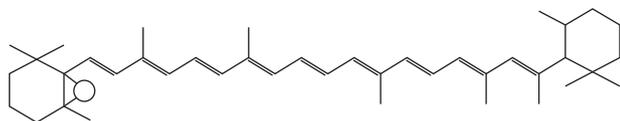


Figura 1. β -caroteno-5,6-epóxido.

Na técnica de partição, a fase DMSO retém os pigmentos polares, tais como, xantofilas livres ou esterificadas. A fração eluída da coluna possivelmente trata-se de astaxantina (Figura 2), um ceto-carotenóide comumente identificado em peixes e crustáceos⁴, levando em conta a presença de um único má-

ximo de absorção a 470 nm (7, 30). O valor intermediário do R_f provavelmente está relacionado com a forma de diéster⁷ e a coloração vermelha alaranjada do pigmento²¹. O pigmento não apresentou mudança de cor ao ser submetido aos vapores de HCl.

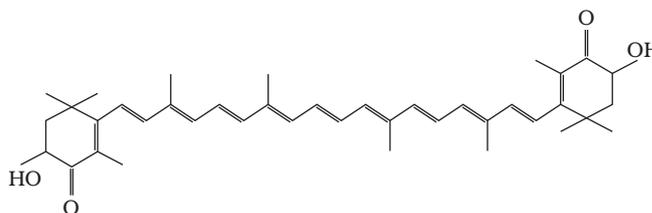


Figura 2. Astaxantina livre. Na astaxantina diéster os grupos hidroxílicos encontram-se ligados aos ácidos graxos.

O pigmento contido na fração acidificada oriunda da saponificação da fração hexano foi identificado por tentativa como astaceno, levando em conta os dados da Tabela 1, comparativamente com aqueles registrados na literatura que registra pico único máximo na faixa de 465 a 477 nm, similares valores de R_f e tonalidades de cores^{9,31,21,27}.

A astaxantina pode ser convertida para astaceno (Figura 3), durante o processamento do pescado e durante as etapas de extração, saponificação e separação dos pigmentos^{22,10,13,18}. O astaceno foi o carotenóide presente na fração acidificada da farinha de carapaça do caranguejo aratu, *Goniopsis cruentata*¹⁸.

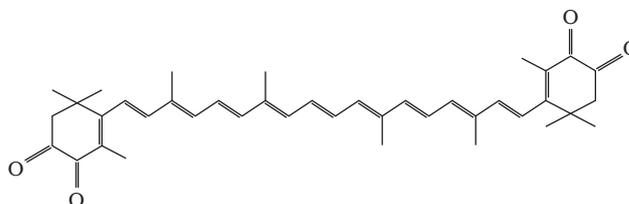


Figura 3. Astaceno (3,3',4,4'-tetraceto- β - β -caroteno)

De acordo com RODRIGUEZ et al.²², a saponificação dos pigmentos em goldfish, *Carasius auratus* resultou na separação de astaceno e cantaxantina em coluna Microcel C.

Confirmando as características de polaridade dos pigmentos descritos na Tabela 1, SPRINGATE e NICKELL²⁵ mostraram que sob análise por CLAE, os pigmentos foram separados em ordem crescente de tempo de retenção em: caroteno, éster de astaxantina, cantaxantina e semiastaceno (uma forma epimérica do astaceno).

Tabela 1. Caracterização das frações hexano, DMSO e acidificada.

Pigmento		Máximos de absorção em hexano (nm)	Nome semi-sistemático	Nome trivial
Fração/cor	R_f^*			
Hexano/Amarelo forte	0,93	448,9; 474	5,6-epóxido-5,6-dihidro- β , β -caroteno	β -caroteno-epóxido
DMSO/Vermelho alaranjado	0,73	470	3,3'- dihidroxi- β , β - caroteno-4,4' diona	Astaxantina diéster
Ácida/Vermelho forte	0,64	468,5	β , β -caroteno-4,4'-diona	Astaceno

*Valores obtidos em placa de sílica gel desenvolvida com benzeno, éter e acetona.

3.2 Composição quantitativa

As concentrações dos pigmentos carotenóides identificados, presentes nas frações hexano, DMSO e acidificada, estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Composição quantitativa dos carotenóides totais presentes nas frações de hexano, DMSO e acidificada.

Pigmento	Concentração		
	mg.100 g ⁻¹ de pasta	mg.100 g ⁻¹ de lipídio	mg.kg ⁻¹ de cabeça seca
β-caroteno-epóxido	1,26	10,8	15,8
Astaxantina	1,71	14,6	21,4
Astaceno	0,79	6,7	9,9
Carotenóide total	3,76	32,1	47,1

Estima-se que o conteúdo de pigmentos carotenóides totais, presentes nas frações hexano, DMSO e acidificada, é da ordem de 3,76 mg.100 g⁻¹ da pasta de pigmentos.

De acordo com CAÚLA⁶, a cabeça de camarão *L. vannamei* contém 74,5% de umidade e 3,7% de lipídios. Na pasta, os teores de umidade e lipídios foram de 72,6 e 11,7%, respectivamente. Estes valores parecem indicar que a pasta é uma emulsão água – óleo. O rendimento em pasta foi muito baixo, correspondendo a 1,2% em relação à cabeça úmida do camarão.

PERDIGÃO et al.²⁰, relataram conteúdos de astaxantina em camarão branco, rosa e caranguejo aratu, de 12,66, 9,93 e 17,7 mg.100 g⁻¹ em óleo pigmentado, respectivamente. Para o caranguejo guaiamum, o teor de astaxantina foi de apenas 2,11 mg.100 g⁻¹ de óleo.

A concentração percentual da astaxantina no produto apresentou-se superior a 45%. Entretanto, comparando-se a sua concentração (14,6 mg.100⁻¹ de lipídios), observa-se um teor levemente inferior ao extraído de cabeça integral de camarão (21,2 mg.100 g⁻¹ de óleo pigmentado), relatado por OGAWA et al.¹⁷.

A revisão realizada por LIÑÁN-CABELLO et al.¹¹ revela que em ovários de crustáceos (camarões e caranguejo), o conteúdo de carotenóides totais varia de 0,7 a 3,6 mg.100 g⁻¹ de amostra úmida, valores estes de acordo com aqueles apresentados na Tabela 2. Todavia, valores extremamente elevados foram relatados por ARREDONDO-FIGUEROA et al.¹, no músculo abdominal (0,82%) e no exoesqueleto (4,1%) de *L. vannamei*.

O conteúdo de carotenóide total, expresso em relação ao peso da cabeça seca, está próximo daquele relatado por SHAHIDI e SYNOWIECKI²⁴ para resíduos desidratados de “snow crab”, que foi de 53,1 mg.kg⁻¹ de caranguejo inteiro e variável com o tipo de tecido analisado (16,4 a 139,9 mg.kg⁻¹).

4. Conclusões

Um crescente interesse no uso de astaxantina na avicultura e piscicultura tem se desenvolvido, uma vez que este pigmento não é sintetizado por animais, devendo ser adicionado nas rações de forma a se obter uma coloração atraente para os consumidores. Além disso, a astaxantina é um poderoso an-

tioxidante e tem propriedades antitumorais, o que aumenta seu potencial de utilização na área da saúde.

A astaxantina comercial é produzida por síntese química, e alternativas naturais estão sendo buscadas em face à crescente preocupação com a segurança alimentar e aspectos negativos dos pigmentos sintéticos.

Considerando os resultados da análise quantitativa e o volume de pasta obtida no experimento, pode-se estimar que a astaxantina seja o pigmento sugerido mais abundante, seguido do β-caroteno-5,6-epóxido e do astaceno. Cada quilo de cabeça de camarão proporcionou 21,4 mg de astaxantina, 15,8 mg de β-caroteno-5,6-epóxido e 9,9 mg de astaceno, sendo possível que rendimentos maiores possam ser observados, desde que sejam adotadas técnicas e equipamentos em escala industrial.

Referências bibliográficas

1. ARREDONDO-FIGUEROA, J. L. et al. Pigmentation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, BOONE 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chili (*Capsicum annuum*) in comparison to astaxanthin. **Rev. Mexicana Ingeniería Química**, v. 2, n. 2, p. 101-108, 2003.
2. BASILIO, F. F. F. et al. Elaboração de saborizante líquido e em pó de cabeça de camarão. In: XIII CONBER 2003, Porto Seguro. **Resumos...** 2003.
3. BIANCHINI, R.; PENTEADO, M. V. C. Carotenóides de pimentões amarelos (*Capsicum annuum*, L.). Caracterização e verificação de mudanças com o cozimento. **Ciência Tecnol. Aliment.**, v. 18, n. 3, p. 283-288, ago./out., 1998.
4. BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB J.**, v. 9, p. 1551-1558, 1995.
5. BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Worked examples of isolation and analysis. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (eds.). **Carotenoids: isolation and analysis**. Basel: Birkhauser Verlag, 1995. p. 243-252. v. 1A.
6. CAÚLA, F. C. B. **Determinação de colesterol e avaliação nutricional de algumas espécies de pescado do Estado do Ceará**. 2003. 99 f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Pesca), Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza.
7. CORAL-HINOSTROZA, G. N.; BJERKENG, B. Astaxanthin from the red crab langostilla (*Pleuroncodes planipes*): optical R/S isomers and fatty acid moieties of astaxanthin esters. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 133B, n. 3, p. 437-444, 2002.
8. HOLANDA, H. D. de. **Hidrólise enzimática dos Resíduos do Camarão Sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e Caracterização dos Subprodutos**. Campinas, 2004. 162 f. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição) Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.
9. HSIEH, L. K. et al. Biosynthesis of carotenoids in *Brevibacterium* sp. KY-4313. **J. Bacteriology**, v. 118, n. 2, p. 385-393, 1974.
10. IBRAHIM, A. L.; SHIMIZU, C.; KONO, M. Pigmentation of cultured red sea bream, *Chrysophrys major*, using astaxanthin from Antarctic krill, *Euphausia superba*, and a mysid, *Neomysis* sp. **Aquaculture**, v. 38, n. 1, p. 45-57, 1984.
11. LIÑÁN-CABELLO, M. A.; PANIAGUA-MICHEL, J.; HOPKINS, P. M. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 4, p. 299-309, 2002.

12. MATOS, S. R. M. **Caracterização dos Resíduos do Camarão *Litopenaeus vannamei* e avaliação de suas potencialidades como flavorizante**. 2005. 68f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza.
13. NEGRO, J. J.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J. Astaxanthin is the major carotenoid in tissues of White storks (*Ciconia ciconia*) feeding on introduced crayfish (*Procambarus clarkii*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 126B, n. 3, p. 347-352, 2000.
14. NUNES, A. J. P. O cultivo de camarões marinhos no nordeste do Brasil. **Panorama da AQUICULTURA**, v. 11, p. 29-33, maio/junho, 2001.
15. NUNES, M. L.; MOTA, M. H. G.; CARDONHA, A. M. S. Elaboração de farinha a partir de resíduos de camarão. **Boletim de Ciências do Mar**, v. 17, n. 1, p. 1-6, 1978.
16. NUNES, M. L. et al. Comparação de quitina e quitosana de resíduos de camarão de água doce e de caranguejo-uçá. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 1996, Poços de Caldas, 1996.
17. OGAWA, M. et al. Uso Integral da cabeça de camarão cultivado no Ceará. In: XIII CONBEP, 2003, Fortaleza. **Resumos...** 2003.
18. OLIVEIRA, C. C. S. **Pigmentos carotenóides presentes na carapaça do caranguejo aratu *Goniopsis cruentata* (Latreille, 1803)**. 2001. 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza.
19. PENISTON, Q. P.; JOHNSON, E. L. Recovering of chitosan and other by-products from shellfish waste and the like. Disponível em: <<http://www.google.com/patents?vid=USPAT3862122&id=K0ktAAAAEBAJ&printsec=abstract&zoom=4&dq=%22Peniston%22+%22METHOD+OF+RECOVERING+CHITOSAN+AND+OTHER+BY-PRODUCTS+FROM+...%22+#PPA3-IA1,M1>> Acesso em: 23/01/07.
20. PERDIGÃO, N. B. et al. Extração de carotenóides de carapaças de crustáceos em óleo. **Bol. Técn. Cient. CEPENE**, Tamandaré, v. 3, n. 1, p. 231-241, 1995.
21. RALLEY, L. et al. Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. **Plant Journal**, n. 39, n. 4, p. 477-486, 2004.
22. RODRÍGUEZ, D. B.; SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C. O. The biosíntesis of astaxanthin. XVIII. The incorporation and transformation of carotenoids in the goldfish. **Nt.J.Biochem.**, v. 5, p. 157-166, 1974
23. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI Press, 2001. 64 p.
24. SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Nutrient and chemical compositions of Atlantic snow crab offals. In: 15th ANNUAL TROPICAL AND SUBTROPICAL FISHERIES TECHNOLOGICAL CONFERENCE OF THE AMERICAS. **Proceedings...** dec. 2- 5, 1990, Orlando, Florida, p. 334-339.
25. SPRINGATE & NICKELL (2000). Astaxanthin for aquaculture. **Roche Vitamins Ltd**. Printed in Germany, Disponível em: <http://www.dsm.com/en_US/downloads/dnp/caropink.pdf>. Acesso em: 23 jan 2007.
26. THOMPSON, I. et al. The effect of dietary Vitamin A and Astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. **Aquaculture**, v. 133, n. 2, p. 91-102, 1995.
27. TOLOSA, S.; CAKLI, S.; OSTERMEYER, U. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 22, n. 6, p. 787-791, 2005.
28. TORRISSEN, O. J.; CHRISTIANSEN, R. Requirements for carotenoids in fish diets. **J. Appl. Ichthyol.**, v. 11, p. 225-230, 1995.
29. TORRISSEN, O. J.; HARDY, R. W.; SHEARER, K. D. Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism. **CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.**, v. 1, p. 209-225, 1989.
30. TSUKUDA, N.; AMANO, K. Studies on the discoloration of red fishes – I. Content of carotenoid pigments in eighteen species of red fishes. **Bull.Jap.Soc.Sci.Fish**, v. 32, n. 4, p.334-345, 1966.
31. WANG, H.-B. et al. Preliminary identification of red carotenoids from *Potamogeton crispus* L. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 37, n. 9, p. 1363-1368, 2004.