

## Partitioning of Fe, Cu, Zn, Cd, and Pb concentrations among eleven tissues of *Octopus vulgaris* from the Portuguese coast

## Partición de las concentraciones de Fe, Cu, Zn, Cd y Pb entre once tejidos de *Octopus vulgaris* de la costa portuguesa

J Raimundo\*, C Vale

National Institute of Biological Resources – IPIMAR, Av. Brasília, 1449-006 Lisbon, Portugal. \*E-mail: jraimundo@ipimar.pt

### Abstract

Levels of Fe, Cu, Zn, Cd, and Pb were determined in digestive gland, posterior salivary glands, kidneys, gills, gonads, branchial hearts, ink sac, stomach, skin, mantle, and arm of 13 common octopuses, *Octopus vulgaris*, collected in November 2002 at Matosinhos (northwest coast of Portugal). No significant ( $P > 0.05$ ) differences were found between metal concentrations and size/weight, sex, and maturity stage. Median levels found in digestive gland were one order of magnitude above those in all remaining analyzed parts (Cd and Pb), and in all tissues except branchial heart (Fe); posterior salivary glands, gills, mantle, and arm (Zn); and arm (Cu). Iron was significantly higher in digestive gland and branchial heart; Cu was lower in gonads, mantle, and arm; Zn was higher in digestive gland and lower in mantle and arm; Cd was higher in digestive gland, ink sac, and kidneys; and Pb was higher in digestive gland. Strong Pb-Fe, Cd-Fe, and Cu-Zn correlations ( $r > 0.700$ ) were obtained in digestive gland, salivary glands, ink sac, and stomach. The different metal concentrations in the 11 tissues/organs of octopus are apparently a consequence of the role of metals in metabolic functions (e.g., gonads, ink sac, kidneys, gills, and salivary glands), although non-essential elements (Cd and Pb) in digestive gland, branchial hearts, kidneys, and ink sac may be linked to specific ligands or excretory/detoxification mechanisms.

*Key words:* metals, *Octopus vulgaris*, partition, Portugal, tissues.

### Resumen

Se determinaron los niveles de Fe, Cu, Zn, Cd y Pb en glándula digestiva, glándulas salivales posteriores, riñones, branquias, gónadas, corazones branquiales, bolsa de la tinta, estómago, piel, manto y brazo de 13 especímenes del pulpo común, *Octopus vulgaris*, recolectados en noviembre de 2002 en Matosinhos (costa noroccidental de Portugal). No se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las concentraciones de metales y la talla/peso, sexo y estado de madurez. Las medianas de los niveles encontrados en la glándula digestiva fueron un orden de magnitud mayor que los de las demás partes analizadas (Cd y Pb) y de todos los tejidos con excepción del corazón branquial (Fe); glándulas salivales posteriores, branquias, manto y brazo (Zn); y brazo (Cu). El Fe fue significativamente mayor en glándula digestiva y corazón branquial; el Cu fue menor en gónadas, manto y brazo; el Zn fue mayor en glándula digestiva y menor en manto y brazo; el Cd fue mayor en glándula digestiva, bolsa de la tinta y riñones; y el Pb fue mayor en glándula digestiva. Se encontraron fuertes correlaciones entre Pb y Fe, Cd y Fe, y Cu y Zn ( $r > 0.700$ ) para glándula digestiva, glándulas salivales, bolsa de la tinta y estómago. Las diversas concentraciones de metales en los 11 tejidos y órganos del pulpo aparentemente son consecuencia del papel de los metales en sus funciones metabólicas (e.g., gónadas, bolsa de la tinta, riñones, branquias y glándulas salivales), aunque los elementos no esenciales (Cd and Pb) en glándula digestiva, corazones branquiales, riñones y bolsa de la tinta pueden estar asociados con ligandos específicos o con mecanismos de excreción y detoxificación.

*Palabras clave:* metales, *Octopus vulgaris*, partición, Portugal, tejidos.

### Introduction

The common octopus, *Octopus vulgaris*, is a sedentary cephalopod inhabiting coastal waters and thus susceptible to contamination (Mangold 1983). Metal accumulation in its tissues is influenced by local environmental conditions, such as metal levels in water and food chain, exposure period and temperature, as well as size, sex, and maturity stage (Rossi *et al.* 1993, Canli and Atli 2003). Several studies have proved the ability of these organisms to accumulate high levels of

### Introducción

El pulpo común, *Octopus vulgaris*, es un cefalópodo sedentario que habita aguas costeras y por tanto es susceptible a la contaminación (Mangold 1983). La acumulación de metales en sus tejidos es influenciada por condiciones ambientales locales tales como los niveles de metal en el agua y la cadena alimenticia, la temperatura y periodo de exposición, así como la talla, el sexo y el estado de madurez (Rossi *et al.* 1993, Canli y Atli 2003). Varios estudios han mostrado la capacidad de estos

essential and non-essential elements, especially in the digestive gland (e.g., Martin and Flegal 1975; Miramand and Guary 1980; Finger and Smith 1987; Miramand and Bentley 1992; Bustamante *et al.* 1998a, 1998b; Raimundo *et al.* 2004, 2005; Napoleão *et al.* 2005). Accumulation in other tissues has been related to the presence of molecules vital to their specific functions, including excretion and detoxifying mechanisms (Blaschko and Himms 1954, Ghiretti-Magaldi *et al.* 1958, Schipp and Hevert 1978, Rainbow and Phillips 1993, Gerpe *et al.* 2000, Villanueva and Bustamante 2006).

Despite the large amounts of metals retained in the digestive gland and their potential distribution among other tissues and organs, only a few studies have examined metal partitioning among three to five organs/tissues of octopus (e.g., Miramand and Guary 1980, Miramand and Bentley 1992, Nessim and Riad 2003, Napoleão *et al.* 2005). This study reports the concentrations of Fe, Cu, Zn, Cd, and Pb in 11 tissues of the 13 specimens of *O. vulgaris* captured in November 2002 in the northwest coast of Portugal (landed at Matosinhos), which has been reported to have elevated levels of metals (e.g., Cd) in water and octopus (Caetano and Vale 2003, Raimundo *et al.* 2004).

## Material and methods

### Samples

Thirteen common octopuses, *O. vulgaris*, were collected in November 2002 from catches of fishermen at Matosinhos on the northwest coast of Portugal (fig. 1). Specimens were stored in individual plastic bags and immediately frozen onboard in order to minimize mobilization of metals among organs/tissues (Martin and Flegal 1975). Weight, mantle length, and sex were determined for each individual. Sexual maturity was also determined based on the procedures proposed by Guerra (1975). The individuals varied in size and weight over broad ranges (135–210 mm and 844–2609 g, respectively), including males ( $n = 7$ ) and females ( $n = 6$ ), most of them in maturation (stage II). Good relationships between size and weight were found ( $r = 0.89$ ,  $P = 0.001$ ). In the laboratory, digestive gland, posterior salivary glands, kidneys, gills, gonads, branchial hearts, ink sac, stomach, skin, mantle, and arm were totally removed under partial defrost conditions without rupture of tissues. Stomach contents were totally removed when present. After separation, individual tissue samples were freeze-dried, ground, and homogenized for the analysis of Fe, Cu, Zn, Cd, and Pb.

### Analytical procedure

Approximately 200 mg of dry tissue were digested with a mixture of  $\text{HNO}_3$  (65% v/v) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v) at 60°C for 12 h, 100°C for 1 h, and 80°C for 1 h, according to the method described by Ferreira *et al.* (1990). All labware was cleaned with  $\text{HNO}_3$  (20%) for two days and rinsed with Milli-Q water

organismos de acumular altos niveles de elementos esenciales y no esenciales, especialmente en la glándula digestiva (e.g., Martin y Flegal 1975; Miramand y Guary 1980; Finger y Smith 1987; Miramand y Bentley 1992; Bustamante *et al.* 1998a, 1998b; Raimundo *et al.* 2004, 2005; Napoleão *et al.* 2005). La acumulación en otros tejidos se ha relacionado con la presencia de moléculas esenciales para sus funciones específicas, incluyendo mecanismos de excreción y detoxificación (Blaschko y Himms 1954, Ghiretti-Magaldi *et al.* 1958, Schipp y Hevert 1978, Rainbow y Phillips 1993, Gerpe *et al.* 2000, Villanueva y Bustamante 2006).

A pesar de la gran cantidad de metales que se retienen en la glándula digestiva y su potencial distribución hacia otros tejidos y órganos, sólo se han realizado unos cuantos estudios sobre la partición de metales entre tres y cinco órganos o tejidos del pulpo (e.g., Miramand y Guary 1980, Miramand y Bentley 1992, Nessim y Riad 2003, Napoleão *et al.* 2005). El propósito de este trabajo fue determinar las concentraciones de Fe, Cu, Zn, Cd y Pb en 11 tipos de tejidos de 13 especímenes de *O. vulgaris* capturados en noviembre de 2002 en Matosinhos (costa noroccidental de Portugal), sitio que presenta altos niveles de metales (e.g., Cd) en el agua y en pulpos (Caetano y Vale 2003, Raimundo *et al.* 2004).

## Material y métodos

### Muestras

Se obtuvieron 13 especímenes del pulpo común *O. vulgaris* en noviembre de 2002 de las capturas de pescadores de Matosinhos en la costa noroccidental de Portugal (fig. 1). Los especímenes se almacenaron individualmente en bolsas de plástico y se congelaron inmediatamente a bordo para minimizar la movilización de metales entre órganos y tejidos (Martin y Flegal 1975). Se determinaron el peso, largo del manto y sexo de cada individuo. También se determinó la madurez sexual con base en los procedimientos propuestos por Guerra (1975). Los individuos presentaron un gran intervalo de tallas y pesos (135–210 mm y 844–2609 g, respectivamente), incluyendo machos ( $n = 7$ ) y hembras ( $n = 6$ ), la mayoría en estado de maduración sexual (estado II). Se encontraron buenas relaciones entre la talla y el peso ( $r = 0.89$ ,  $P = 0.001$ ). En el laboratorio se retiraron la glándula digestiva, glándulas salivales posteriores, riñones, branquias, gónadas, corazones branquiales, saco de la tinta, estómago, piel, manto y brazo, en condiciones de descongelación parcial, sin romper los tejidos. En caso de observar contenidos estomacales, éstos fueron retirados en su totalidad. Después de su separación, las muestras individuales de los tejidos fueron liofilizadas, pulverizadas y homogeneizadas para el análisis de Fe, Cu, Zn, Cd y Pb.

### Procedimiento analítico

Se digirieron aproximadamente 200 mg de tejido seco con una mezcla de  $\text{HNO}_3$  (65% v/v) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v) a 60°C

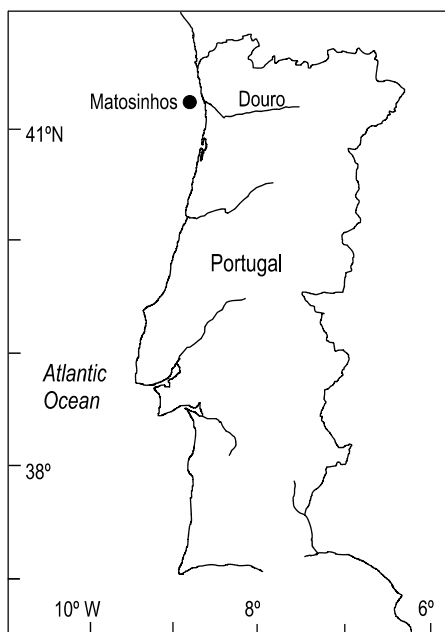


Figure 1. Location of the sampling area of *Octopus vulgaris* on the northwest Portuguese coast (Matosinhos).

Figura 1. Localización de la zona de muestreo de *Octopus vulgaris* en la costa noroccidental de Portugal (Matosinhos).

to avoid contamination. Concentrations of Fe, Cu, Zn, Cd, and Pb were determined by flame atomic absorption spectrometry (Perkin Elmer AAnalyst 100) or graphite furnace atomic absorption spectrometry (Perkin Elmer, Zeeman 4110ZL). The accuracy of these analytical methods was assessed by the analysis of international certificate standards: DORM-1 and DORM-2 (dogfish muscle), DOLT-1 and DOLT-2 (dogfish liver), and TORT-1 and TORT-2 (lobster hepatopancreas). Obtained and certified values did not differ significantly ( $P \leq 0.05$ ). Metal concentrations are given as ranges and medians ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , dry weight).

#### Statistical analysis

Prior to statistical analysis, metal concentrations and biological parameters were tested for normality and equality of variances. The Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests were applied to all data in order to detect differences between metal concentrations and biological parameters and tissues. The significance used for statistical analyses was  $P < 0.05$ . The statistical analyses were performed using the Statistica 6.0 statistical software system.

## Results

### Metal concentrations

Figure 2 presents the median, 25 and 75% percentiles, minimum and maximum, and the extreme values and outliers, of metal concentrations in the octopi tissues analyzed (digestive

durante 12 h, 100°C durante 1 h y 80°C durante 1 h, siguiendo el método descrito por Ferreira *et al.* (1990). Se lavó todo el material de laboratorio con  $\text{HNO}_3$  (20%) durante dos días, enjuagándose en agua Milli-Q para evitar su posible contaminación. Se determinaron las concentraciones de Fe, Cu, Zn, Cd y Pb mediante espectrometría de absorción atómica con llama (Perkin Elmer AAnalyst 100) o espectrometría de absorción atómica en horno de grafito (Perkin Elmer, Zeeman 4110ZL). Se evaluó la precisión de estos métodos analíticos mediante el análisis de materiales de referencia certificados: DORM-1 y DORM-2 (músculo de pez perro), DOLT-1 y DOLT-2 (hígado de pez perro) y TORT-1 y TORT-2 (hepatopáncreas de langosta). No se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los valores obtenidos y los certificados. Las concentraciones de metales se presentan como intervalos y medianas ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco).

### Análisis estadístico

Antes de realizar el análisis estadístico se comprobó la normalidad y equitatividad de varianzas de las concentraciones de metales y los parámetros biológicos. Se aplicaron la prueba U de Mann-Whitney y la de Kruskal-Wallis a todos los datos para detectar diferencias entre las concentraciones de metales y los parámetros biológicos y los tejidos. Se utilizó una significancia de  $P < 0.05$  para todos los análisis estadísticos, los cuales se realizaron usando el programa Statistica 6.0.

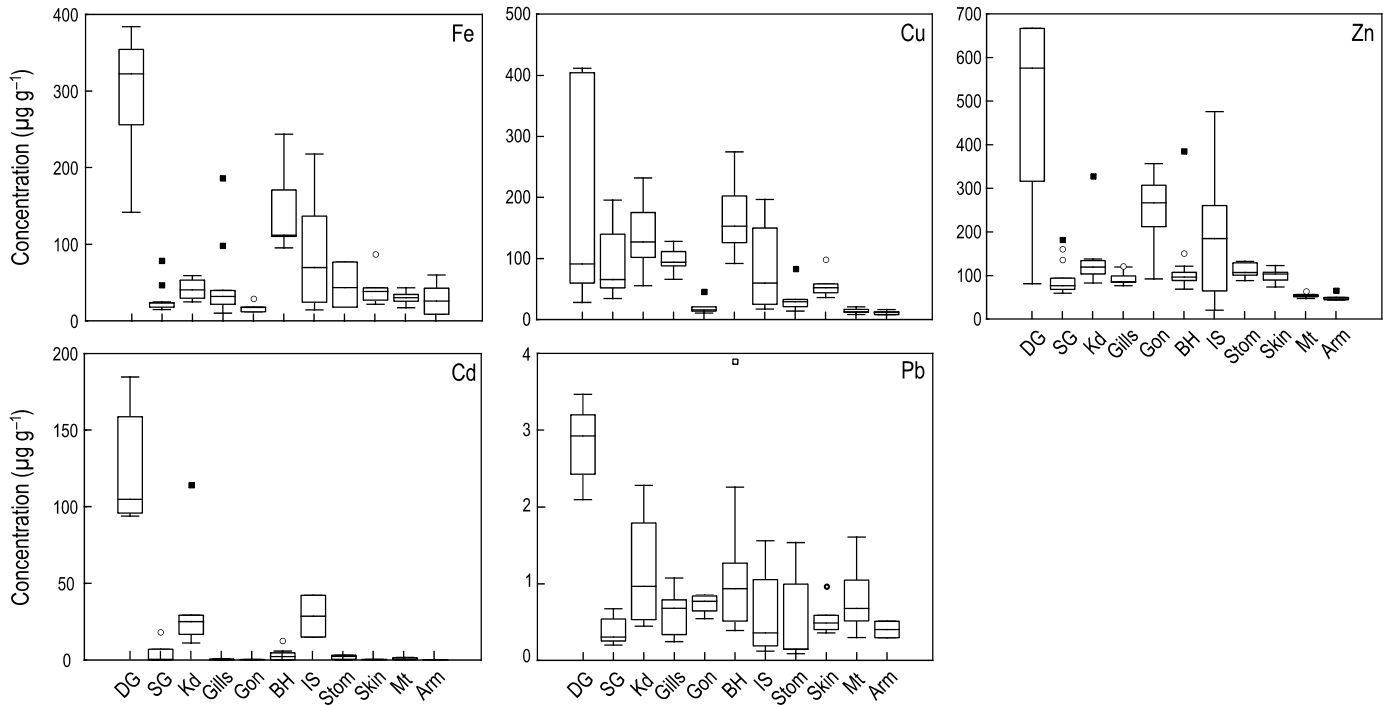
## Resultados

### Concentraciones de metales

En la figura 2 se muestran la mediana, los percentiles 25 y 75%, los valores mínimo y máximo, así como los valores extremos y alejados de las concentraciones de metales en los tejidos de los pulpos analizados (glándula digestiva, corazones branquiales, riñones, glándulas salivales posteriores, saco de la tinta, branquias, estómago, manto, brazo, piel y gónadas). Las concentraciones de Fe variaron de 8.5  $\mu\text{g g}^{-1}$  (brazo) a 384  $\mu\text{g g}^{-1}$  (glándula digestiva), Cu de 8.2  $\mu\text{g g}^{-1}$  (brazo) a 762  $\mu\text{g g}^{-1}$  (glándula digestiva), Zn de 43  $\mu\text{g g}^{-1}$  (brazo) a 667  $\mu\text{g g}^{-1}$  (glándula digestiva), Cd de 0.024  $\mu\text{g g}^{-1}$  (glándula salivares posteriores) a 185  $\mu\text{g g}^{-1}$  (glándula digestiva), y Pb de 0.087  $\mu\text{g g}^{-1}$  (estómago) a 3.5  $\mu\text{g g}^{-1}$  (glándula digestiva).

### Efecto de la talla/peso y sexo en la concentración de metales

Las concentraciones de Fe, Cu, Zn, Cd y Pb en los tejidos analizados no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en la talla/peso, lo que sugiere que el crecimiento ejerció un efecto mínimo sobre la acumulación de metales dentro de los intervalos de talla/peso de los individuos muestreados.



**Figure 2.** Median, 25 and 75% percentiles, minimum and maximum, and extreme values ( $\square$ ) and outliers ( $\circ$ ) of Fe, Cu, Zn, Cd, and Pb concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) in the digestive gland (DG), posterior salivary glands (SG), kidneys (Kd), gills, gonads (Gon), branchial hearts (BH), ink sac (IS), stomach (Stom), skin, mantle (Mt), and arm of common octopus *Octopus vulgaris*.

**Figura 2.** Mediana, percentiles 25 y 75%, valores mínimo y máximo, y valores extremos ( $\square$ ) y alejados ( $\circ$ ) de las concentraciones de Fe, Cu, Zn, Cd y Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) en glándula digestiva (DG), glándulas salivales posteriores (SG), riñones (Kd), branquias (gills), gónadas (Gon), corazones branquiales (BH), saco de la tinta (IS), estómago (Stom), piel (skin), manto (Mt) y brazo (arm) del pulpo común *Octopus vulgaris*.

gland, branchial hearts, kidneys, posterior salivary glands, ink sac, gills, stomach, mantle, arm, skin, and gonads). Iron concentrations ranged from  $8.5 \mu\text{g g}^{-1}$  (arm) to  $384 \mu\text{g g}^{-1}$  (digestive gland), Cu from  $8.2 \mu\text{g g}^{-1}$  (arm) to  $762 \mu\text{g g}^{-1}$  (digestive gland), Zn from  $43 \mu\text{g g}^{-1}$  (arm) to  $667 \mu\text{g g}^{-1}$  (digestive gland), Cd from  $0.024 \mu\text{g g}^{-1}$  (posterior salivary glands) to  $185 \mu\text{g g}^{-1}$  (digestive gland), and Pb from  $0.087 \mu\text{g g}^{-1}$  (stomach) to  $3.5 \mu\text{g g}^{-1}$  (digestive gland).

#### Effect of size/weight and sex on metal concentration

Concentrations of Fe, Cu, Zn, Cd, and Pb in the tissues analyzed showed no significant ( $P > 0.05$ ) differences in size/weight, suggesting that growth has minor effects on metal accumulation within the size/weight ranges of the sampled individuals.

#### Metal-metal correlations

The correlations between metal concentrations were only obtained for digestive gland, posterior salivary glands, ink sac, and stomach (table 1). The Pb-Fe relationship was found in all these tissues/organs except in salivary glands. Cadmium was correlated to Fe, Cu, and Zn in salivary glands.

#### Correlaciones metal-metal

Sólo se obtuvieron correlaciones entre las concentraciones de metales para glándula digestiva, glándulas salivales posteriores, saco de la tinta y estómago (tabla 1). Se observó una relación entre el Pb y el Fe en todos los tejidos y órganos, con excepción de las glándulas salivales, mientras que en estas últimas el Cd se correlacionó con Fe, Cu y Zn.

#### Diferencias de Fe, Cu, Zn, Cd y Pb entre los tejidos

Los niveles de Fe en glándula digestiva y corazón branquial fueron significativamente mayores que en todos los tejidos analizados con excepción del saco de la tinta. El estómago, riñones, piel, branquias, manto y brazo mostraron valores similares (fig. 2). Los niveles de Cu en gónadas, manto y brazo fueron significativamente menores que en los demás tejidos y órganos, exceptuando el estómago. La glándula digestiva presentó una gran variabilidad con valores de 28 a  $762 \mu\text{g g}^{-1}$ . El Zn en glándula digestiva fue estadísticamente mayor que en manto y brazo (valores bajos) y en los demás tejidos (valores intermedios). Las gónadas presentaron valores significativamente diferentes a los de otros tejidos, con excepción del saco de la tinta. Las glándulas salivales posteriores, riñones, branquias, corazones branquiales, estómago y piel mostraron concentraciones similares. La partición de Cd resultó ser la más

### Differences of Fe, Cu, Zn, Cd, and Pb among tissues

Levels of Fe in the digestive gland and branchial heart were significantly higher than in all the tissues analyzed, except ink sac. Stomach, kidneys, skin, gills, mantle, and arm exhibited similar values (fig. 2). Copper levels in gonads, mantle and arm were significantly lower than in the other tissues and organs, with the exception of the stomach. Digestive gland exhibited high variability, ranging from 28 to 762  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Zinc in the digestive gland was statistically higher than in mantle and arm (low) and in all the other tissues (intermediate values). Gonads exhibited significantly different values from the other tissues, except ink sac. Posterior salivary glands, kidneys, gills, branchial hearts, stomach, and skin presented similar concentrations. The partitioning of Cd was clearer since levels in the digestive gland, ink sac, and kidney were significantly higher than in all the other tissues and organs analyzed. Digestive gland also presented significantly higher levels of Pb. Salivary glands showed lower Pb than the other tissues, with the exception of skin, ink sac, and stomach.

### Discussion

#### Comparison with other studies

The lack of relationships between size/weight and sex with metal concentrations is in line with other studies reporting similar concentrations in small and large individuals of other octopus species, *Graneledone* sp. and *Benthoctopus thielei* (Bustamante *et al.* 1998a), and of the same species (Seixas *et al.* 2005); however, *Octopus salutii* showed a negative relationship between Cd concentrations and weight (Storelli and Marcotrigiano 1999). Furthermore, metal concentration did not differ between males and females, which agrees with other cephalopod studies (Miramand and Bentley 1992, Bustamante *et al.* 1998a, Barghigiani *et al.* 2000), though higher levels of Fe have been detected in females (Seixas *et al.* 2005). Due to the absence of relationships, the 11 specimens were treated independently of their size and sex. Comparing with other studies, the Fe, Cu, Zn, and Pb levels fall within the concentration ranges of each tissue reported for *O. vulgaris* from various coastal waters (table 2). The Cd levels in tissues of octopus from the northwest Portuguese coast exceeded some of the values reported in the literature, which may be attributed to the high availability of Cd in coastal waters associated with river inputs (Caetano and Vale 2003, Raimundo *et al.* 2004).

#### Accumulated metals in organs/tissues

##### Digestive gland

The digestive gland exhibited the highest metal concentrations. Medians were one order of magnitude above those in all other analyzed parts (Cd and Pb), and in all tissues except branchial heart (Fe); posterior salivary glands, gills, mantle,

**Table 1.** Metal-metal correlations (*r*) and associated probabilities (a, 0.05; b, 0.01; c, 0.001) in the digestive gland, salivary glands, ink sac, and stomach of *Octopus vulgaris* captured at Matosinhos.

**Tabla 1.** Correlaciones metal-metal (*r*) y sus probabilidades asociadas (a, 0.05; b, 0.01; c, 0.001) en glándula digestiva, glándulas salivales, bolsa de la tinta y estómago de *Octopus vulgaris* capturado en Matosinhos.

		Fe	Pb	Cd	Cu	Zn
Digestive gland	Pb	0.85b	–	0.939c	–	–
Ink sac	Pb	0.918c	–	–	–	–
Stomach	Pb	0.729a	–	–	–	–
Salivary glands	Cd	0.922c	0.700a	–	0.968c	0.726a

clara ya que los niveles en glándula digestiva, saco de la tinta y riñones fueron significativamente mayores que en todos los demás tejidos y órganos analizados. La glándula digestiva también presentó niveles significativamente mayores de Pb. Se registraron niveles más bajos de Pb en las glándulas salivales que en los demás tejidos, con excepción de la piel, el saco de la tinta y estómago.

### Discussión

#### Comparación con otros trabajos

La ausencia de relaciones entre talla/ peso y sexo con las concentraciones de metales concuerda con otros estudios que registraron concentraciones similares en individuos pequeños y grandes de otras especies de pulpo, *Graneledone* sp. y *Benthoctopus thielei* (Bustamante *et al.* 1998a), y de la misma especie (Seixas *et al.* 2005); sin embargo, *Octopus salutii* presentó una relación negativa entre las concentraciones de Cd y el peso (Storelli y Marcotrigiano 1999). Además, las concentraciones de metales no difirieron entre machos y hembras, lo que también concuerda con otros estudios de cefalópodos (Miramand y Bentley 1992, Bustamante *et al.* 1998a, Barghigiani *et al.* 2000), aunque se han detectado mayores niveles de Fe en hembras (Seixas *et al.* 2005). Debido a la ausencia de relaciones, los 11 especímenes se trataron independientemente de su talla y sexo. Al comparar con otros trabajos se observó que los niveles de Fe, Cu, Zn y Pb se encuentran dentro de los intervalos de concentración de cada tejido registrados para *O. vulgaris* de otras aguas costeras (tabla 2). Los niveles de Cd en los tejidos del pulpo de la costa noroccidental de Portugal excedieron algunos de los valores encontrados en la literatura, lo cual puede atribuirse a la gran disponibilidad de Cd en aguas costeras relacionada con las descargas de ríos (Caetano y Vale 2003, Raimundo *et al.* 2004).

#### Metales acumulados en órganos y tejidos

##### Glándula digestiva

La glándula digestiva presentó las mayores concentraciones de metales. Las medianas fueron un orden de magnitud

**Table 2.** Comparison of Fe, Zn, Cu, Cd, and Pb levels ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) in the digestive gland, branchial hearts, gills, gonads, posterior salivary glands, mantle, arm, and mantle skin of *Octopus vulgaris* from Matosinhos (present study) with data from the literature.

**Tabla 2.** Comparación de los niveles de Fe, Zn, Cu, Cd y Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) en glándula digestiva, corazones branquiales, branquias, gónadas, glándulas salivales posteriores, manto, brazo y piel del manto de *Octopus vulgaris* de Matosinhos (este estudio) con datos disponibles en la literatura.

Organ/tissue of <i>O. vulgaris</i>	Fe	Cu	Zn	Cd	Pb	Reference
Digestive gland	142–384	28–762	81–667	94–185	0.71–3.5	Present study
	–	139–3140	200–14721	19–761	0.037–44	Raimundo <i>et al.</i> (2004)
	–	137–1465	198–14721	20–269	–	Raimundo <i>et al.</i> (2005)
	790 $\pm$ 343	1768 $\pm$ 1010	1463 $\pm$ 726	–	6.9 $\pm$ 3.2	Napoleão <i>et al.</i> (2005)
	700 $\pm$ 130	2500 $\pm$ 700	1450 $\pm$ 400	50 $\pm$ 10	–	Miramand and Guary (1980)
	130–875	8.6–286	113–437	34–218	–	Soldevilla (1987)
Branchial hearts	95–1270	92–274	68–386	0.032–88	0.39–3.9	Present study
	650 $\pm$ 150	500 $\pm$ 40	65 $\pm$ 15	0.08 $\pm$ 0.04	–	Miramand and Guary (1980)
	577 $\pm$ 323	188 $\pm$ 68	81 $\pm$ 23	–	8.1 $\pm$ 5.0	Napoleão <i>et al.</i> (2005)
	41–69	14–58	58–121	2.5–3.8	8.3–9.4	Nessim and Riad (2003)
Gills	10–252	66–128	76–122	0.16–22	0.25–1.1	Present study
	40 $\pm$ 28	113 $\pm$ 47	72 $\pm$ 17	–	–	Napoleão <i>et al.</i> (2005)
	19–87	92–253	44–94	17	–	Soldevilla (1987)
	11–16	11–21	24–38	1.2–2.0	2.1–4.4	Nessim and Riad (2003)
Gonads	12–29	11–46	92–357	0.067–2.0	0.54–0.85	Present study
	30 $\pm$ 10	50 $\pm$ 8	360 $\pm$ 200	0.1 $\pm$ 0.04	–	Miramand and Guary (1980)
	18–28	27–42	8.1–26	1.0–2.6	1.5–15	Nessim and Riad (2003)
Posterior salivary glands	15–79	34–195	59–182	0.024–18	0.20–0.67	Present study
	19–32	12–36	56–116	3.1–4.4	2.0–23	Nessim and Riad (2003)
Mantle	17–43	8.3–62	47–64	0.25–4.4	0.30–1.6	Present study
	11–84	17–106	41–186	23	–	Soldevilla (1987)
	30 $\pm$ 5	26 $\pm$ 1	70 $\pm$ 30	0.08 $\pm$ 0.04	–	Miramand and Guary (1980)
	8.7–48	13–99	59–193	0.13–11.1	0.056–4.3	Raimundo <i>et al.</i> (2004)
	24 $\pm$ 15	30 $\pm$ 19	76 $\pm$ 22	–	–	Napoleão <i>et al.</i> (2005)
	14–81	12–68	67–121	0.27–3.3	–	Raimundo <i>et al.</i> (2005)
	11–16	13–20	5.2–13	1.3–1.8	1.8–7.4	Nessim and Riad (2003)
Arm	8.5–60	8.2–16	43–66	0.11–0.26	0.29–2.2	Present study
	14–58	5.5–72	53–107	0.035–1.0	–	Raimundo <i>et al.</i> (2005)
	40–50	4–203	50–300	20	3–4	Seixas <i>et al.</i> (2005)
	5.7–49	5.5–20	64–119	0.053–1.3	0.058–0.87	Raimundo <i>et al.</i> (2004)
	10–76	7.8–36	53–75	1.8	–	Soldevilla (1987)
Skin	22–87	36–98	73–123	0.16–3.2	0.36–1.0	Present study
	30 $\pm$ 10	50 $\pm$ 4	50 $\pm$ 10	0.04 $\pm$ 0.01	–	Miramand and Guary (1980)
	11–19	12–18	11–16	1.4–2.3	3.6–7.4	Nessim and Riad (2003)

and arm (Zn); and arm (Cu). The elevated levels corroborate the presence of efficient mechanisms to store metals in this organ (e.g., Martin and Flegal 1975; Miramand and Guary 1980; Smith *et al.* 1984; Miramand and Bentley 1992;

mayor que las de todas las otras partes analizadas (Cd y Pb) y de todos los tejidos con excepción del corazón branquial (Fe); glándulas salivales posteriores, branquias, manto y brazo (Zn); y brazo (Cu). Los niveles elevados corroboran la presencia de

Bustamante *et al.* 1998a, 1998b, 2002; Raimundo *et al.* 2004; Napoleão *et al.* 2005; Seixas *et al.* 2005). In cephalopods, the ratio between metal concentrations in digestive gland and muscle has been used to separate elements into three groups (Miramand and Bentley 1992): poorly concentrated (ratio < 10), moderately concentrated (10 < ratio < 50), and highly concentrated (ratio > 50). The calculation of this ratio showed that Pb (ratio: 4–6) was poorly concentrated; Fe (ratio: 11–13), Cu (ratio: 17–20), and Zn (ratio: 11–12) were moderately concentrated; and Cd (ratio: 98–585) was highly concentrated. The strong association of Cd with lysosomes and cytosolic proteins (Finger and Smith 1987, Castillo and Maita 1991, Bustamante *et al.* 2002) appears to be emphasized in octopus from the northwestern region of Portugal probably due to higher availability (Caetano and Vale 2003).

### Gills and stomach

The high levels of Cu in gills are in line with other studies (Soldevilla 1987) that linked its abundance to hemocyanin, Cu being one of the main components of this respiratory pigment (Soldevilla 1987, Craig and Overnell 2003, Villanueva and Bustamante 2006). Iron, Zn, and Cd were higher in the stomach, while Cu and Pb showed increased concentrations in gills, suggesting preferential uptake through food or water.

### Mantle, arms, and skin

As reported previously (Raimundo *et al.* 2004), the levels of Cd and Pb in mantle were significantly higher than in arm, pointing to efficient binding sites in that tissue. Different protein composition (Kariya *et al.* 1986) may contribute to the distinct accumulation. Iron, Zn, and Cu were more concentrated in skin than in mantle and arms. These differences were found in other studies (Miramand and Guary 1980, Miramand and Bentley 1992), suggesting changes in environmental availability. Since these tissues are consumed by humans, the levels were compared to the safety limit established by the European Commission (1.0  $\mu\text{g g}^{-1}$  w.w. of Cd and Pb, *Journal of the European Communities* 2001, EC rule no. 466/2001). Tissues of only 4 of the 13 specimens analyzed presented Cd and Pb levels above these limits (Cd = 1.1, 1.2, and 3.1  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; and Pb = 1.5  $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

### Salivary glands

Copper was the main concentrated metal in the salivary gland of the octopuses containing a mixture of several toxic substances used to kill the prey (Kanda *et al.* 2003). Abundant Cu in *O. vulgaris* has been observed by Nessim and Riad (2003) and may be related to Cu-amine oxidase (Blaschko and Himms 1954).

mecanismos eficientes para almacenar metales en este órgano (e.g., Martin y Flegal 1975; Miramand y Guary 1980; Smith *et al.* 1984; Miramand y Bentley 1992; Bustamante *et al.* 1998a, 1998b, 2002; Raimundo *et al.* 2004; Napoleão *et al.* 2005; Seixas *et al.* 2005). En cefalópodos se ha usado la razón entre las concentraciones de metales en glándula digestiva y músculo para separar los elementos en tres grupos (Miramand y Bentley 1992): poco concentrados (razón < 10), moderadamente concentrados (10 < razón < 50) y altamente concentrados (razón > 50). El cálculo de esta razón mostró poca concentración de Pb (razón: 4–6); concentraciones moderadas de Fe (razón: 11–13), Cu (razón: 17–20) y Zn (razón: 11–12); y una alta concentración de Cd (razón: 98–585). La fuerte asociación del Cd con las lisosomas y proteínas citosólicas (Finger y Smith 1987, Castillo y Maita 1991, Bustamante *et al.* 2002) parece ser más notable en pulpos de la región noroccidental de Portugal, probablemente como consecuencia de una mayor disponibilidad de este metal (Caetano y Vale 2003).

### Branquias y estómago

Los altos niveles de Cu en las branquias concuerdan con lo encontrado en otros trabajos (Soldevilla 1987) que relacionaron su abundancia con la hemocianina, ya que este metal es uno de los componentes principales de este pigmento respiratorio (Soldevilla 1987, Craig y Overnell 2003, Villanueva y Bustamante 2006). Los niveles de Fe, Zn y Cd fueron mayores en el estómago, mientras que Cu y Pb mostraron concentraciones mayores en las branquias, lo que indica una captación preferencial a través de la comida o el agua.

### Manto, brazos y piel

Al igual que lo previamente reportado por Raimundo *et al.* (2004), los niveles de Cd y Pb en el manto fueron significativamente mayores que en el brazo, lo que indica la existencia de sitios de captación eficientes en ese tejido. Una composición diferente de proteínas (Kariya *et al.* 1986) puede contribuir a una distinta acumulación. El Fe, Zn y Cu se concentraron más en la piel que en el manto y los brazos. En otros estudios se han encontrado diferencias similares (Miramand y Guary 1980, Miramand y Bentley 1992), lo cual sugiere cambios en la disponibilidad ambiental de estos elementos. Como estos tejidos se destinan al consumo humano, se compararon sus niveles de metal con el límite de seguridad establecido por la Comisión Europea (1.0  $\mu\text{g g}^{-1}$  p.h. de Cd y Pb, *Journal of the European Communities* 2001, reglamento número 466/2001). Los tejidos de sólo 4 de los 13 especímenes analizados presentaron niveles de Cd y Pb por encima de estos límites (Cd = 1.1, 1.2 y 3.1  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; y Pb = 1.5  $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

### Glándulas salivales

El Cu fue el principal metal concentrado en las glándulas salivales del pulpo, las cuales contienen una mezcla de varias

### Branchial hearts

The high levels of Fe and Cu in branchial hearts agree with the findings of Miramand and Guary (1980) for the same species on the coast of Monaco. The presence of adenochromes may be responsible for Fe complexation (Ghiretti-Magaldi *et al.* 1958), and of respiratory pigment hemocyanin by the elevated Cu (Miramand and Guary 1980). Branchial hearts also presented enhanced levels of Cd and Pb that may be related to storage and detoxification mechanisms (Guary and Fowler 1982) linked to the circulatory and excretory functions of these organs (Schipp and Hevert 1978, Villanueva and Bustamante 2006).

### Kidneys

The kidney concentrated elevated levels of Pb, as well as of Cd and Cu which have been registered in *Eledone cirrhosa* and *Sepia officinalis* (Miramand and Bentley 1992) and *O. vulgaris* (Miramand and Guary 1980), and interpreted as the result of the excretory function (Rainbow and Phillips 1993).

### Ink sac

The high levels of Cu and Zn may be associated with melanin (Bustamante *et al.* 1998a), and Cd related to excretory pathway of the ink.

### Gonads

The gonads presented enhanced levels of Zn, concurring with different studies (Miramand and Guary 1980, Miramand and Bentley 1992, Bustamante *et al.* 1998a, Gerpe *et al.* 2000) and related to high quantities of Zn-containing enzymes and metalloproteins (Gerpe *et al.* 2000).

In summary, metal concentrations differed considerably among the 11 tissues/organs of octopus, apparently as a consequence of the role of metals in metabolic functions (e.g., gonads, ink sac, kidneys, gills, and salivary glands). The presence of non-essential elements (Cd and Pb) in the digestive gland, branchial hearts, kidney, and ink sac may be linked to specific ligands or excretory/detoxification mechanisms.

### Acknowledgements

This work was supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology (project "Cadmium detoxification in cephalopods").

### References

Barghigiani C, Ristori T, Biagi F, de Reneri S. 2000. Size-related mercury accumulations in edible marine species from an area of the northern Tyrrhenian Sea. *Water, Air, Soil Pollut.* 124: 169–176.

sustancias tóxicas para matar a sus presas (Kanda *et al.* 2003). Nessim y Riad (2003) observaron una abundancia de Cu en *O. vulgaris* que puede asociarse con la amina oxidasa que contiene Cu (Blaschko y Himms 1954).

### Corazones branquiales

Los altos niveles de Fe y Cu en corazones branquiales concuerdan con lo registrado por Miramand y Guary (1980) para la misma especie en la costa de Mónaco. La presencia de adenocromos puede ser responsable de la complejación del Fe (Ghiretti-Magaldi *et al.* 1958), así como del pigmento respiratorio hemocianina por el alto nivel de Cu (Miramand y Guary 1980). Los corazones branquiales también presentaron mayores niveles de Cd y Pb, posiblemente relacionados con los mecanismos de almacenamiento y detoxificación (Guary y Fowler 1982) asociados con las funciones de circulación y excreción de estos órganos (Schipp y Hevert 1978, Villanueva y Bustamante 2006).

### Riñones

Los riñones concentraron niveles altos de Pb, así como de Cd y Cu, los mismos que han sido registrados en *Eledone cirrhosa* y *Sepia officinalis* (Miramand y Bentley 1992) y en *O. vulgaris* (Miramand y Guary 1980), lo cual fue interpretado como un efecto de su función excretora (Rainbow y Phillips 1993).

### Saco de la tinta

Los altos niveles de Cu y Zn en el saco de la tinta pueden estar asociados con la melanina (Bustamante *et al.* 1998a), y los de Cd con la vía de excreción de la tinta.

### Gónadas

Las gónadas presentaron elevados niveles de Zn, lo cual concuerda con otros trabajos (Miramand y Guary 1980, Miramand y Bentley 1992, Bustamante *et al.* 1998a, Gerpe *et al.* 2000) y se ha relacionado con la gran cantidad de metaloproteínas y enzimas que contienen Zn (Gerpe *et al.* 2000).

En resumen, las concentraciones de metales difirieron considerablemente entre los 11 tejidos y órganos del pulpo, aparentemente como consecuencia del papel de los metales en sus funciones metabólicas (e.g., gónadas, saco de la tinta, riñones, branquias y glándulas salivales). La presencia de elementos no esenciales (Cd y Pb) en glándula digestiva, corazones branquiales, riñones y saco de la tinta puede estar relacionado con ligandos específicos o con mecanismos de excreción y detoxificación.



- Blaschko H, Himms J. 1954. Enzymic oxidation of amines in decapods. *J. Exp. Biol.* 31: 2–7.
- Bustamante P, Cherel Y, Caurant F, Miramand P. 1998a. Cadmium, copper and zinc in octopuses from Kerguelen Islands, Southern Indian Ocean. *Polar Biol.* 19: 264–271.
- Bustamante P, Caurant F, Fowler S, Miramand P. 1998b. Cephalopods as a vector for the transfer of cadmium to top marine predators in the north-east Atlantic Ocean. *Sci. Total Environ.* 220: 71–80.
- Bustamante P, Cosson R, Gallien I, Caurant F, Miramand P. 2002. Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Mar. Environ. Res.* 53: 227–241.
- Caetano M, Vale C. 2003. Trace-elemental composition of seston and plankton along the Portuguese coast. *Acta Oecol.* 24: S341–S349.
- Canli M, Atli G. 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environ. Pollut.* 121: 129–136.
- Castillo L, Maita Y. 1991. Isolation and partial characterisation of cadmium binding proteins from the oceanic squid, *Ommastrephes bartrami*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 42: 26–34.
- Craig S, Overnell J. 2003. Metals in squid, *Loligo forbesi*, eggs and hatchlings. No evidence for a role for Cu- or Zn-metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.* 134C: 311–317.
- Ferreira A, Cortesão C, Castro O, Vale C. 1990. Accumulation of metals and organochlorines in tissues of the oyster *Crassostrea angulata* from the Sado Estuary. *Sci. Total Environ.* 97/98: 627–639.
- Finger J, Smith J. 1987. Molecular association of Cu, Zn, Cd and  $^{210}\text{Po}$  in the digestive gland of the squid *Nototodarus gouldi*. *Mar. Biol.* 95: 87–91.
- Gerpe M, de Moreno J, Patat M. 2000. Cadmium, zinc and copper accumulation in the squid *Illex argentinus* from the southwest Atlantic Ocean. *Mar. Biol.* 136: 1039–1044.
- Ghiretti-Magaldi A, Giuditta A, Ghiretti F. 1958. Pathways of terminal respiration in marine invertebrates. I. The respiratory system in cephalopods. *J. Cell. Comp. Physiol.* 52: 389–429.
- Guary J, Fowler S. 1982. Experimental studies on the biokinetics of plutonium and americium in the cephalopod *Octopus vulgaris*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 7: 327–335.
- Guerra A. 1975. Determinación de las diferentes fases del desarrollo sexual de *Octopus vulgaris* Lamarck, mediante un índice de madurez. *Invest. Pesq.* 39: 397–416.
- Kanda A, Iwakoshi-Ukena E, Takuwa-Kuroda K, Minakata H. 2003. Isolation and characterization of novel tachykinins from the posterior salivary gland of the common octopus *Octopus vulgaris*. *Peptides* 24: 35–43.
- Kariya Y, Ochiai Y, Hashimoto K. 1986. Protein components and ultrastructure of the arm and mantle muscles of octopus *Octopus vulgaris*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 52: 131–138.
- Mangold K. 1983. *Octopus vulgaris*. In: Boyle P (ed.), *Cephalopod Life Cycles, Species Accounts*. Academic Press, UK, pp. 335–364.
- Martin J, Flegal A. 1975. High copper concentrations in squid livers in association with elevated levels of silver, cadmium and zinc. *Mar. Biol.* 30: 51–55.
- Miramand P, Guary J. 1980. Association of americium-241 with adenochromes in the branchial hearts of the cephalopod *Octopus vulgaris*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 4: 127–129.
- Agradecimientos**
- Este trabajo recibió apoyo de la Fundación de Ciencia y Tecnología de Portugal (proyecto “Destoxificación de cadmio en cefalópodos”).
- Traducido al español por Christine Harris.
- 
- Miramand P, Bentley D. 1992. Concentration and distribution of heavy metals in tissues of two cephalopods, *Eledone cirrhosa* and *Sepia officinalis*, from the French coast of the English Channel. *Mar. Biol.* 114: 407–414.
- Napoleão P, Pinheiro T, Sousa Reis C. 2005. Elemental characterization of tissues of *Octopus vulgaris* along the Portuguese coast. *Sci. Total Environ.* 345:41–49.
- Nessim R, Riad R. 2003. Bioaccumulation of heavy metals in *Octopus vulgaris* from coastal waters of Alexandria (eastern Mediterranean). *Chem. Ecol.* 19: 275–281.
- Raimundo J, Caetano M, Vale C. 2004. Geographical variation and partition of metals in tissues of *Octopus vulgaris* along the Portuguese coast. *Sci. Total Environ.* 325: 71–81.
- Raimundo J, Pereira P, Vale C, Caetano M. 2005. Fe, Zn, Cu and Cd in the digestive gland and muscle tissues of *Octopus vulgaris* and *Sepia officinalis* from coastal areas in Portugal. *Cienc. Mar.* 31: 243–251.
- Rainbow P, Phillips D. 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.* 26: 593–601.
- Rossi A, Pellegrini D, Belcari P, Barghigiani C. 1993. Mercury in *Eledone cirrhosa* from the northern Tyrrhenian Sea: Contents and relations with life cycle. *Mar. Pollut. Bull.* 26: 683–686.
- Schipp R, Hevert F. 1978. Distribution of copper and iron in some central organs of *Sepia officinalis* (Cephalopoda). A comparative study by flameless atomic absorption and electron microscopy. *Mar. Biol.* 47: 391–399.
- Seixas S, Bustamante P, Pierce G. 2005. Accumulation of mercury in the tissues of the common octopus *Octopus vulgaris* (L.) in two localities on the Portuguese coast. *Sci. Total Environ.* 340: 113–122.
- Smith J, Plues L, Heyraud M, Cherry R. 1984. Concentrations of the elements Ag, Al, Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb and Zn, and the radionuclides  $^{219}\text{Pb}$  and  $^{210}\text{Po}$  in the digestive gland of the squid *Nototodarus gouldi*. *Mar. Environ. Res.* 13: 55–68.
- Soldevilla F. 1987. Metales pesados en el pulpo común (*Octopus vulgaris*) del banco sahariano (costas NO de Africa). *Alimentaria* 33: 33–37.
- Storelli M, Marcotrigiano G. 1999. Cadmium and total mercury in some cephalopods from the South Adriatic Sea (Italy). *Food Addit. Contam.* 16: 261–265.
- Villanueva R, Bustamante P. 2006. Composition in essential and non-essential elements of early stages of cephalopods and dietary effects on the elemental profiles of *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture* 261: 225–240.

Recibido en febrero de 2008;  
aceptado en agosto de 2008.