

Fe, Zn, Cu and Cd concentrations in the digestive gland and muscle tissues of *Octopus vulgaris* and *Sepia officinalis* from two coastal areas in Portugal

Concentraciones de Fe, Zn, Cu y Cd en la glándula digestiva y los tejidos musculares de *Octopus vulgaris* y *Sepia officinalis* de dos zonas costeras de Portugal

Joana Raimundo*
Patrícia Pereira
Carlos Vale
Miguel Caetano

IPIMAR
Institute for Fisheries and Sea Research
Av. Brasília, 1449-006 Lisbon, Portugal
* E-mail: joanar@ipimar.pt

Recibido en junio de 2003 ; aceptado en abril de 2004

Abstract

Concentrations of Fe, Zn, Cu and Cd were measured in the mantle, arm and digestive gland of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) and in the mantle and digestive gland of *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) captured at two sites on the Portuguese coast during 2001. The most abundant element was Zn, reaching 121 $\mu\text{g g}^{-1}$ in muscle tissues; Fe and Cu presented a similar range of concentration, 5.4–81 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 3.3–72 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively; and Cd varied between 0.010 and 3.3 $\mu\text{g g}^{-1}$. Metal concentrations in the digestive gland were two and three orders of magnitude higher than those recorded in the mantle and arm. The relationship between metal concentration and body weight was found mainly in the digestive gland and rarely in the mantle and arm. The Cd:Zn and Cd:Cu ratios were particularly high in the digestive gland of the two species captured at the most contaminated site and presented positive linear relationships with the body weight. This suggests a progressive accumulation of Cd in the digestive gland of octopus and cuttlefish with growth, in comparison to the essential elements Zn and Cu.

Key words: metals, digestive gland, cephalopods, Portugal.

Resumen

Se midieron las concentraciones de Fe, Zn, Cu y Cd en el manto, el brazo y la glándula digestiva de *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) y en el manto y la glándula digestiva de *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758), capturados en dos zonas de la costa portuguesa durante 2001. El elemento más abundante fue Zn, alcanzando 121 $\mu\text{g g}^{-1}$ en los tejidos musculares; Fe y Cu presentaron un intervalo de concentración similar, 5.4–81 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 3.3–72 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente; y Cd varió entre 0.010 y 3.3 $\mu\text{g g}^{-1}$. Las concentraciones de metales en la glándula digestiva fueron dos y tres órdenes de magnitud superiores que los registrados en el manto y brazo. La relación entre la concentración de metal y el peso corporal se encontró principalmente con la glándula digestiva y raramente con el manto y brazo. Las razones Cd:Zn y Cd:Cu fueron particularmente altas para la glándula digestiva de las dos especies capturadas en la zona más contaminada y presentaron una relación lineal con el peso corporal. Esto sugiere una acumulación progresiva de Cd en las glándulas digestivas del pulpo y la sepia con el crecimiento, en comparación con los elementos esenciales Zn y Cu.

Palabras clave: metales, glándula digestiva, cefalópodos, Portugal.

Introduction

Metal concentrations in cephalopods from several regions are well documented (e.g., Smith *et al.*, 1984; Miramand and Bentley, 1992; Bustamante *et al.*, 2000). Most of these studies have highlighted the ability of these organisms to concentrate Zn, Cu and Cd in the digestive gland even in environments of low metal contamination. This organ has a major physiological function in the digestive process of cephalopods, supplying

Introducción

La concentración de metales en cefalópodos de varias regiones está bien documentada (e.g., Smith *et al.*, 1984; Miramand y Bentley, 1992; Bustamante *et al.*, 2000). La mayoría de estos estudios han enfatizado la capacidad de estos organismos de concentrar Zn, Cu y Cd en la glándula digestiva aun en ambientes de baja contaminación por metales. Este órgano tiene una función fisiológica primordial en el proceso

most of the digestive enzymes and storing nutrients and trace elements (Bustamante, 1998). The accumulation of non-essential metals in marine organisms, like Cd, is probably related to efficient sequestration and detoxification mechanisms (Rainbow *et al.*, 1990). One well-known detoxification strategy of marine invertebrates involves the binding of trace metals to metallothioneins (Bebianno and Langston, 1991; Viarengo and Nott, 1993). These molecules have not been found in cephalopods (Bustamante *et al.*, 2002), but proteins with higher molecular weight (>70 kDa) have been reported as potential binding sites for Cd in the digestive gland of cephalopod species (Tanaka *et al.*, 1983; Finger and Smith, 1987; Castillo *et al.*, 1990).

Essential elements (e.g., Zn and Cu) are regulated in organisms by homeostatic mechanisms (Langston *et al.*, 1998), although non-essential metals (e.g., Cd) may occasionally substitute them (Zauke and Petri, 1993). These interactions between metals have been assessed through metal-metal correlations (Smith *et al.*, 1984) and by the ratios Cd:Cu and Cd:Zn (Bustamante *et al.*, 1998). Ratios have been determined in the digestive gland of *Benthoctopus thielei*, *Eledone cirrhosa*, *Graneledone* sp., *Octopus vulgaris* and *Sepia officinalis* and higher ratios interpreted as competition and/or substitution of essential metals by Cd (Miramand and Guary, 1980; Miramand and Bentley, 1992; Bustamante *et al.*, 1998).

Octopus vulgaris (common octopus) and *Sepia officinalis* (cuttlefish) are important fishery resources in several coastal regions. These species are voracious cephalopods with sedentary habits (Boletzky, 1983; Mangold, 1983). The Portuguese coastal area presents different metal concentrations in seawater, seston and mussel tissues between the northwestern and southern coasts (Vale *et al.*, 1985; Caetano and Vale, 2003). The present work reports the concentrations of Fe, Zn, Cu and Cd in the muscle tissues and digestive gland of *O. vulgaris* and *S. officinalis* captured on the northwestern and southern coasts of Portugal. The Cd:Cu and Cd:Zn ratios were examined in organisms at different growth stages from both areas.

Materials and methods

Sampling and sample preparation

The species *O. vulgaris* and *S. officinalis* were captured at site A (northwest coast) and at site B (south coast) during 2001 (fig. 1). Twelve octopuses were obtained at each site, while thirty-one cuttlefish were collected from site A and eight from site B. The organisms were immediately frozen (-25°C) on board in individual plastic bags. In the laboratory, organisms were weighed, measured (mantle length) and sexed. Each organism was considered individually. Muscle tissues (arm and mantle) without skin and the digestive gland were removed from the octopuses, and the mantle and digestive gland from cuttlefish. In order to avoid contamination from other organs, only the inner part of the digestive gland was sampled.

digestivo de los cefalópodos, ya que suministra la mayoría de las enzimas digestivas y almacena nutrientes y elementos traza (Bustamante, 1998). La acumulación de metales no esenciales, como el Cd, en organismos marinos probablemente está relacionada con mecanismos eficientes de secuestro y detoxificación (Rainbow *et al.*, 1990). Una estrategia de detoxificación bien conocida incluye la unión de metales traza a metalotioneínas (Bebianno y Langston, 1991; Viarengo y Nott, 1993). En los cefalópodos no se han encontrado estas moléculas (Bustamante *et al.*, 2002), pero diversos autores han mencionado proteínas con un alto peso molecular (>70 kDa) como potenciales puntos de unión para el Cd en la glándula digestiva de estas especies (Tanaka *et al.*, 1983; Finger y Smith, 1987; Castillo *et al.*, 1990).

En los organismos los elementos esenciales (e.g., Zn y Cu) son regulados mediante mecanismos homeostáticos (Langston *et al.*, 1998), aunque estos metales pueden, ocasionalmente, ser sustituidos por metales no esenciales (e.g., Cd) (Zauke y Petri, 1993). Estas interacciones entre metales han sido evaluadas por correlaciones metal-metal (Smith *et al.*, 1984), así como por las razones Cd:Cu y Cd:Zn (Bustamante *et al.*, 1998). Estas razones se han determinado en la glándula digestiva de *Benthoctopus thielei*, *Eledone cirrhosa*, *Graneledone* sp., *Octopus vulgaris* y *Sepia officinalis* y las más elevadas han sido interpretadas como competencia y/o sustitución de los metales esenciales por el Cd (Miramand y Guary, 1980; Miramand y Bentley, 1992; Bustamante *et al.*, 1998).

Octopus vulgaris (pulpo común) y *Sepia officinalis* (sepia) son recursos pesqueros importantes en varias regiones costeras. Estas especies son cefalópodos voraces con hábitos sedentarios (Boletzky, 1983; Mangold, 1983). La zona costera de Portugal presenta diferencias en cuanto a las concentraciones de metales en agua de mar, seston y tejidos de moluscos entre la costa noroccidental y la del sur (Vale *et al.*, 1985; Caetano y Vale, 2003). El presente trabajo reporta las concentraciones de Fe, Zn, Cu y Cd en los tejidos musculares y la glándula digestiva de *O. vulgaris* y *S. officinalis* capturados en las costas del noroccidente y el sur de Portugal, estudiándose las razones Cd:Cu y Cd:Zn en organismos en diferente etapa de crecimiento de ambas áreas.

Materiales y métodos

Muestreo y preparación de muestras

Se capturaron las especies *O. vulgaris* y *S. officinalis* en la zona A (costa noroccidental) y la zona B (costa del sur) durante 2001 (fig. 1). Se obtuvieron 12 pulpos en cada una de ellas, mientras que se recolectaron 31 sepias de la zona A y 8 de la zona B. Los organismos fueron congelados (-25°C) inmediatamente a bordo en bolsas de plástico individuales. En el laboratorio, los organismos fueron pesados y medidos (longitud del manto) y fue determinado su sexo. Cada organismo fue considerado individualmente. Se extrajeron los tejidos musculares (brazo y manto) sin piel y la glándula digestiva del pulpo,

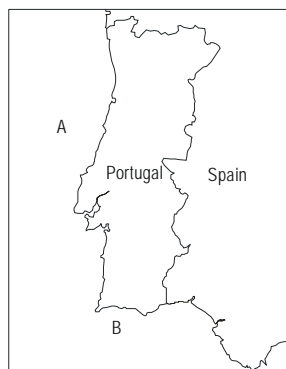


Figure 1. Geographical location of the sampling sites (A,B).
Figura 1. Localización geográfica de las zonas de muestreo (A, B).

Analytical procedure

Tissue samples were freeze-dried, homogenized and digested with HNO_3 and H_2O_2 according to the method described in Ferreira *et al.* (1990). Concentrations of Fe, Zn, Cu and Cd were determined either by flame atomic absorption spectrophotometry (Perkin Elmer Analyst 100) or graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (Perkin Elmer 4110ZL). All labware was cleaned with HNO_3 and HCl and rinsed with Milli-Q water. The accuracy of the analytical procedure was assessed by the analysis of international standard reference materials DORM-1, DOLT-2 and TORT-1 (National Research Council of Canada). For all metals investigated, the obtained and certified values were not statistically different ($P < 0.01$). Blanks and standard reference materials were run together with samples. All the results are given in micrograms of metal per gram of dry weight tissue ($\mu\text{g g}^{-1}$ dw). Detection limits were $4.2 \mu\text{g g}^{-1}$ for Fe, $0.50 \mu\text{g g}^{-1}$ for Zn, $1.2 \mu\text{g g}^{-1}$ for Cu and $0.010 \mu\text{g g}^{-1}$ for Cd. Precision errors were 2%, 1%, 8% and 2% for Fe, Zn, Cu and Cd, respectively.

Range and median were obtained for each element. Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests, and a two-tailed Student *t*-test.

Results

Relationship between mantle length and body weight

The number of individuals, mantle length and body weight of *O. vulgaris* and *S. officinalis* specimens collected at sites A and B are presented in table 1. Octopuses captured at the two sites were similar in length ($P < 0.05$) and weight ($P < 0.05$), while cuttlefish from site A showed higher mantle length and weight than those from site B ($P < 0.05$). The length of all the octopuses analyzed was highly correlated to weight ($r^2 = 0.85$) (fig. 2). Despite the differences in length and weight of cuttlefish from both sites, these parameters were also highly correlated ($r^2 = 0.91$).

y el manto y la glándula digestiva de la sepia. Para evitar la contaminación por otros órganos, sólo se muestreó la parte interna de la glándula digestiva.

Procedimiento analítico

Las muestras de tejido fueron liofilizadas, homogeneizadas y digeridas con HNO_3 y H_2O_2 de acuerdo con el método descrito por Ferreira *et al.* (1990). Las concentraciones de Fe, Zn, Cu y Cd fueron determinadas mediante espectrofotometría de absorción atómica con llama (Perkin Elmer Analyst 100) o espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito (Perkin Elmer 4110ZL). Todo el material de laboratorio se lavó con HNO_3 y HCl, y se enjuagó con agua Milli-Q. Se evaluó la precisión del procedimiento analítico mediante el análisis de materiales estándares de referencia internacional DORM-1, DOLT-2 y TORT-1 (Consejo Nacional de Investigación de Canadá). Para ninguno de los metales estudiados, los valores obtenidos y certificados difirieron estadísticamente ($P < 0.01$). Blancos y materiales de referencia se procesaron junto con las muestras. Todos los resultados se presentan en microgramos de metal por gramo de peso seco del tejido ($\mu\text{g g}^{-1}$ ps). Los límites de detección fueron $4.2 \mu\text{g g}^{-1}$ para Fe, $0.50 \mu\text{g g}^{-1}$ para Zn, $1.2 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cu y $0.010 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cd. Los errores de precisión fueron 2%, 1%, 8% y 2% para Fe, Zn, Cu y Cd, respectivamente.

Se obtuvieron el intervalo y la mediana de cada elemento. Los análisis estadísticos fueron realizados usando las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, y una prueba *t* de Student de dos colas.

Resultados

Relación entre longitud del manto y peso corporal

En la tabla 1 se presentan el número de individuos, la longitud del manto y el peso corporal de los especímenes de *O. vulgaris* y *S. officinalis* recolectados en las zonas A y B. La longitud ($P < 0.05$) y el peso ($P < 0.05$) de los pulpos capturados en las dos zonas fueron similares, mientras que la longitud del manto y el peso de las sepias de la zona A fueron superiores que las de la zona B ($P < 0.05$). La longitud de todos

Table 1. Number of specimens, mantle length (cm) and body weight (g) of *Octopus vulgaris* and *Sepia officinalis* captured in sites A and B.
Tabla 1. Número de especímenes, longitud del manto (cm) y peso corporal (g) de *Octopus vulgaris* y *Sepia officinalis* capturados en las zonas A y B.

	<i>Octopus vulgaris</i>		<i>Sepia officinalis</i>	
	Site A	Site B	Site A	Site B
Sample size	12	12	31	8
Mantle length (cm)	13–21	11–18	13–25	11–18
Body weight (g)	680–2820	496–2240	186–1450	145–495

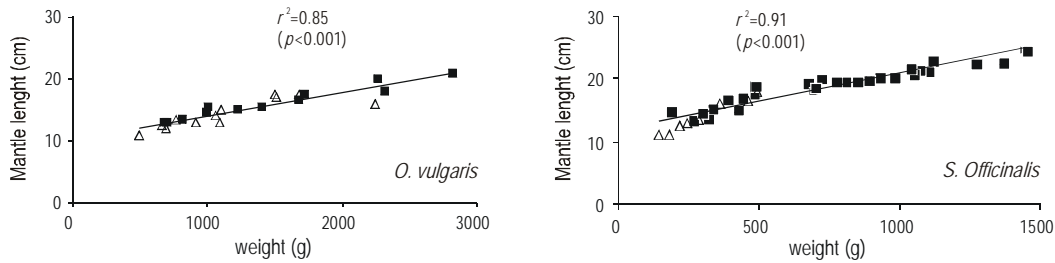


Figure 2. Relationships between mantle length (cm) and body weight (g) of *Octopus vulgaris* and *Sepia officinalis* captured at sites A (■) and B (△).

Figura 2. Relación entre la longitud del manto (cm) y el peso corporal (g) de *Octopus vulgaris* y *Sepia officinalis* capturados de las zonas A (■) y B (△).

Metal concentrations in mantle and arm

The concentrations of Fe, Cu, Zn and Cd in the mantle and arm of *O. vulgaris* and in the mantle of *S. officinalis* are presented in table 2. The most abundant element was Zn, reaching 121 µg g⁻¹; Fe and Cu presented a similar range of concentration, of 5.4–81 µg g⁻¹ and 3.3–72 µg g⁻¹, respectively; and Cd varied between 0.010 and 3.3 µg g⁻¹. In most cases, the concentrations in these tissues were not correlated with sex ($P < 0.05$) or body weight ($P < 0.05$). Exceptions were found at site B: Cu (µg g⁻¹) in the octopus arm increased with weight (g) ($y = 0.038x - 5.4$, $r^2 = 0.62$); and Zn levels in the cuttlefish mantle decreased with weight ($y = -0.12x + 121$, $r^2 = 0.79$). Metals in muscle tissues differ between the two sites. The concentrations of Cd in octopus and cuttlefish muscle tissues were higher at site A ($P < 0.05$). The concentrations of Cd in the mantle of octopus from site A (median = 1.8 µg g⁻¹) were notably higher in comparison to values of other mantle and arm samples (max. 0.81 µg g⁻¹). That value exceeds the safety limit (1.0 µg g⁻¹ dw) for human consumption (Journal of EU Communities, 2001). The level of Cd in mantle of cuttlefish from both sites was below this limit (site A median = 0.16 µg g⁻¹ and site B median = 0.025 µg g⁻¹). Enhanced values at site A were also observed for Fe in octopus mantle ($P < 0.05$). The Cu concentrations in octopus arm and cuttlefish mantle were higher at site B ($P < 0.05$). The Zn concentrations in the tissues analyzed were similar at both sites ($P < 0.05$).

Metal concentrations in the digestive gland

The concentrations of Fe, Cu, Zn and Cd in the digestive gland of *O. vulgaris* and *S. officinalis* are presented in table 3. At both sites, the digestive gland of octopus presented higher levels of Fe and lower values of Zn than those of cuttlefish. Most octopus specimens captured at site A showed higher Cd concentrations than cuttlefish. Cadmium was particularly high in the digestive gland of both octopus (median = 185 µg g⁻¹) and cuttlefish (median = 137 µg g⁻¹) from site A, when compared to values from site B (32 and 35 µg g⁻¹, respectively). In contrast, median Cu concentrations in the digestive

los pulpos analizados estuvo altamente correlacionada con el peso ($r^2 = 0.85$) (fig. 2). A pesar de las diferencias en longitud y peso de las sepias de ambas zonas, estos parámetros también estuvieron altamente correlacionados ($r^2 = 0.91$).

Concentraciones de metales en el manto y brazo

En la tabla 2 se presentan las concentraciones de Fe, Cu, Zn y Cd en el manto y brazo de *O. vulgaris* y en el manto de *S. officinalis*. El elemento más abundante fue Zn, alcanzando

Table 2. Ranges and median concentrations of Fe, Cu, Zn and Cd (µg g⁻¹, dry weight) in the mantle and arm of *Octopus vulgaris* and the mantle of *Sepia officinalis* captured at sites A and B.

Tabla 2. Intervalos y concentraciones medianas de Fe, Cu, Zn y Cd (µg g⁻¹, peso seco) en el manto y brazo de *Octopus vulgaris* y en el manto de *Sepia officinalis* capturados en las zonas A y B.

		<i>Octopus vulgaris</i>		<i>Sepia officinalis</i>	
		Site A	Site B	Site A	Site B
Fe	Mantle	22–81 (29)	6.5–58 (13)	5.4–40 (12)	5.9–17 (10)
	Arm	14–58 (22)	14–57 (21)	–	–
Cu	Mantle	14–68 (30)	12–50 (29)	3.3–14 (8.6)	4.7–19 (12)
	Arm	5.5–14 (8.6)	15–72 (26)	–	–
Zn	Mantle	67–110 (87)	70–121 (86)	62–101 (79)	62–113 (88)
	Arm	56–93 (71)	53–107 (67)	–	–
Cd	Mantle	0.47–3.3 (1.8)	0.27–0.81 (0.47)	0.027–0.81 (0.16)	0.010– (0.025)
	Arm	0.15–0.60 (0.28)	0.035–1.0 (0.16)	–	–

gland of octopus and cuttlefish from site A were lower than those from site B (601 and 998 $\mu\text{g g}^{-1}$ for octopus, and 293 and 2765 $\mu\text{g g}^{-1}$ for cuttlefish, respectively). Zinc presented a similar pattern: median concentrations for octopus were 616 and 2541 $\mu\text{g g}^{-1}$ at sites A and B, respectively, and for cuttlefish they were 907 and 2754 $\mu\text{g g}^{-1}$. The concentrations of Zn and Cu in the digestive gland of octopus and cuttlefish from site A were poor although significantly correlated to body weight; smaller organisms presented higher concentrations (fig. 3). A positive correlation between Cd and body weight was found only in the digestive gland of octopus from site A. No significant correlations between Fe and weight were obtained. At site B, no correlations were found between metal concentrations in the digestive gland and body weight of the two species.

Discussion

The results obtained in this study revealed extremely high concentrations of Cd in the digestive glands of *O. vulgaris* and *S. officinalis* captured on the northwest coast of Portugal. These values exceeded levels reported for the same species in the Mediterranean Sea and North Atlantic (Miramand and Guary, 1980; Miramand and Bentley, 1992), and for other cephalopods species, namely *Eledone cirrhosa* (Miramand and Bentley, 1992), *Loligo opalescens* (Martin and Flegal, 1975) and *Nototodarus gouldi* (Finger and Smith, 1987). The concentrations in the mantle and arm were much lower, indicating that Cd, as well as Fe, Cu and Zn are preferentially accumulated in the digestive gland. This partition is in line with other findings, where the digestive gland of several cephalopod species reveals considerably higher accumulation of metals than muscles, branchial hearts, gills, digestive tract, kidney, genital tract, skin and shell (Miramand and Guary, 1980; Miramand and Bentley, 1992). On the basis of Cd concentrations and weight of the octopus and cuttlefish tissues analyzed from both

121 $\mu\text{g g}^{-1}$; Fe y Cu presentaron intervalos similares de concentración, de 5.4–81 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 3.3–72 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente; y Cd varió entre 0.010 y 3.3 $\mu\text{g g}^{-1}$. En la mayoría de los casos, las concentraciones en estos tejidos no estuvieron correlacionadas con el sexo ($P < 0.05$) o peso corporal ($P < 0.05$), pero en la zona B ocurrieron excepciones: en el brazo de pulpo el Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$) incrementó con el peso (g) ($y = 0.038x - 5.4$, $r^2 = 0.62$); y en el manto de sepia los niveles de Zn disminuyeron con el peso ($y = -0.12x + 121$, $r^2 = 0.79$). Los metales en los tejidos musculares difieren entre ambas zonas. Las concentraciones de Cd en los tejidos de pulpo y sepia son mayores en la zona A ($P < 0.05$). En la zona A las concentraciones de Cd en el manto de pulpo (mediana = 1.8 $\mu\text{g g}^{-1}$) fueron notablemente mayores en comparación con los valores de otras muestras de manto y brazo (máx. 0.81 $\mu\text{g g}^{-1}$). Ese valor excede el límite de seguridad (1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps) para el consumo humano (*Journal of EU Communities*, 2001). En ambas zonas el nivel de Cd en el manto de sepia se encontró por debajo de este límite (mediana de la zona A = 0.16 $\mu\text{g g}^{-1}$ y de la zona B = 0.025 $\mu\text{g g}^{-1}$). En la zona A también se observó un incremento en los valores de Fe en el manto de pulpo ($P < 0.05$). Las concentraciones de Cu en el brazo de pulpo y manto de sepia fueron mayores en la zona B ($P < 0.05$). Las concentraciones de Zn en los tejidos analizados fueron similares en ambas zonas ($P < 0.05$).

Concentraciones de metales en la glándula digestiva

En la tabla 3 se presentan las concentraciones de Fe, Cu, Zn y Cd en la glándula digestiva de *O. vulgaris* y *S. officinalis*. En ambas zonas la glándula digestiva de pulpo muestra niveles mayores de Fe y menores de Zn que los de la sepia. La mayoría de los especímenes de pulpo capturados en la zona A presentaron mayores concentraciones de Cd que los de sepia. El Cd fue particularmente alto en la glándula digestiva tanto de los pulpos (mediana = 185 $\mu\text{g g}^{-1}$) como de las sepias (mediana = 137 $\mu\text{g g}^{-1}$) de la zona A, en comparación con los valores de la zona B (32 y 35 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente). En contraste, las concentraciones medianas de Cu en la glándula digestiva de pulpo y sepia de la zona A fueron menores que los de la zona B: 601 y 998 $\mu\text{g g}^{-1}$ para pulpo, y 293 y 2765 $\mu\text{g g}^{-1}$ para sepia, respectivamente. El Zn presentó un patrón similar: las concentraciones medianas de pulpo fueron 616 y 2541 $\mu\text{g g}^{-1}$ en las zonas A y B, respectivamente, y las de sepia fueron 907 y 2754 $\mu\text{g g}^{-1}$. Las concentraciones de Zn y Cu en la glándula digestiva de pulpo y sepia de la zona A fueron pobres aunque significativamente correlacionadas con el peso corporal; los organismos más pequeños presentaron concentraciones mayores (fig. 3). Sólo se encontró una correlación positiva entre Cd y el peso corporal en la glándula digestiva de pulpo de la zona A. No se obtuvieron correlaciones significativas entre Fe y el peso. En la zona B no se encontraron correlaciones entre las concentraciones de metales en la glándula digestiva y el peso corporal de ambas especies.

Table 3. Ranges and median concentrations of Fe, Cu, Zn and Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$, dry weight) in the digestive gland of *Octopus vulgaris* and *Sepia officinalis* captured at sites A and B.

Tabla 3. Intervalos y concentraciones medianas de Fe, Cu, Zn y Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$, peso seco) en la glándula digestiva de *Octopus vulgaris* y *Sepia officinalis* capturados en las zonas A y B.

	<i>Octopus vulgaris</i>		<i>Sepia officinalis</i>	
	Site A	Site B	Site A	Site B
Fe	292–1199 (893)	294–1202 (925)	156–470 (258)	272–766 (465)
Cu	137–1150 (601)	719–1465 (998)	68–1761 (293)	900–5054 (2765)
Zn	198–863 (616)	1044–14721 (2541)	220–2698 (907)	640–5678 (2754)
Cd	136–269 (185)	20–122 (32)	52–557 (137)	10–41 (35)

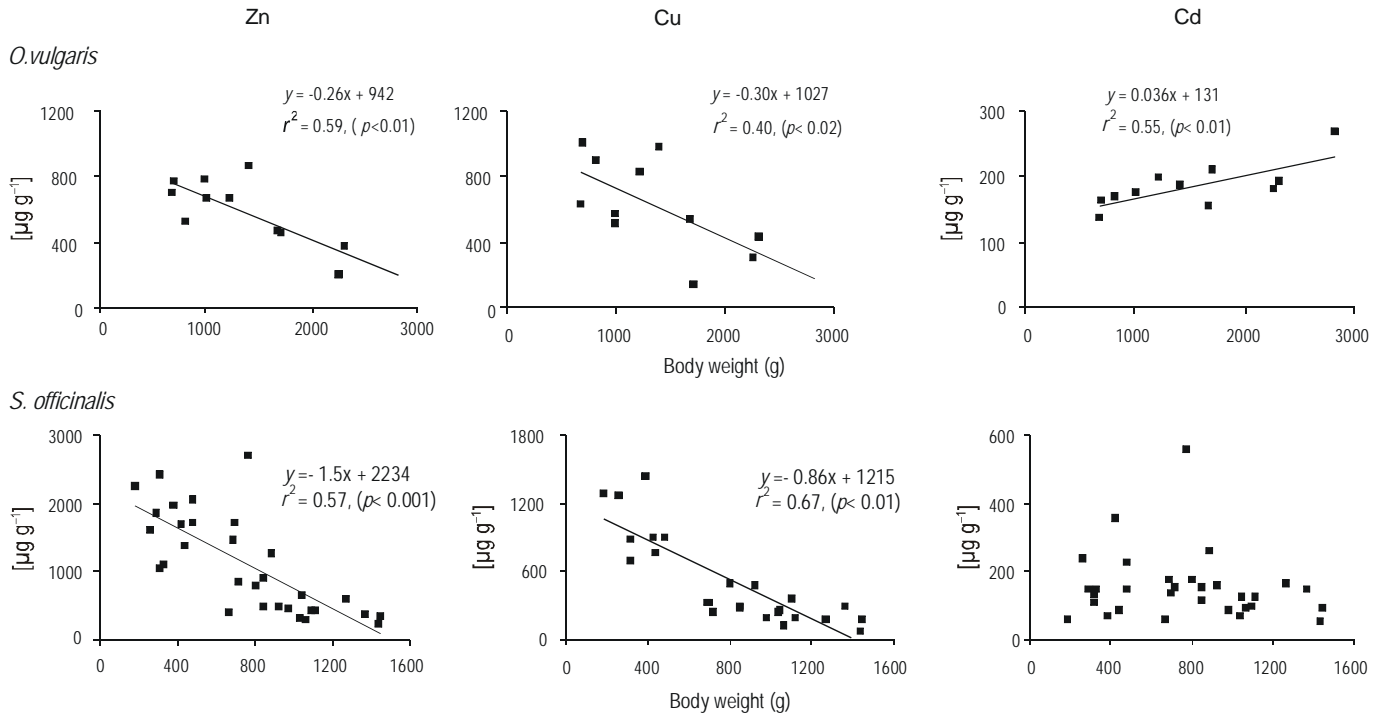


Figure 3. Relationships between Zn, Cu and Cd concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$) in the digestive gland and body weight (g) of *Octopus vulgaris* and *Sepia officinalis* from site A.

Figura 3. Relación entre las concentraciones de Zn, Cu y Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$) en la glándula digestiva y el peso corporal (g) de *Octopus vulgaris* y *Sepia officinalis* de la zona A.

sites, one may conclude that more than 90% of the total body Cd is sequestered in the digestive gland. This estimation, which agrees with calculations presented in other studies (Bustamante, 1998; Bustamante *et al.*, 2002), emphasizes the capacity of the digestive gland to accumulate Cd. Although this capacity has been observed in cephalopods from areas with reduced levels of contamination (Bustamante *et al.*, 1998), higher Cd levels in the digestive gland of species captured in contaminated areas (Bustamante *et al.*, 2000) suggest that accumulation in this organ is also related to the environment.

The levels of Cd in the digestive gland and muscle tissues of octopus and cuttlefish from the northwest coast (site A) were one order of magnitude higher than those from the south coast (site B). This contrast seems related to the differences of Cd availability in the waters of both sites. In fact, water quality surveys in 2000 and 2001 along the Portuguese coast revealed higher concentrations of Cd in the northwestern coastal waters than in the southern ones (Caetano and Vale, 2003). As octopus and cuttlefish have sedentary habits (Boletzky, 1983; Mangold, 1983), presumably specimens captured at site A were exposed to higher levels of Cd during their life span than those at site B. Higher accumulation of Cd in the digestive gland of specimens from site A appears, therefore, to reflect this environmental exposure; however, enhanced values in the mantle and arms indicate that the sequestration capacity of that organ did not avoid the transfer of Cd to muscle tissues.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron concentraciones de Cd extremadamente altas en la glándula digestiva de *O. vulgaris* y *S. officinalis* capturados en la costa noroccidental de Portugal. Estos valores excedieron los niveles encontrados en esta misma especie en el Mar Mediterráneo y el Atlántico Norte (Miramand y Guary, 1980; Miramand y Bentley, 1992), así como para otras especies de cefalópodos, como son *Eledone cirrhosa* (Miramand y Bentley, 1992), *Loligo opalescens* (Martin y Flegal, 1975) y *Nototodarus gouldi* (Finger y Smith, 1987). Las concentraciones en el manto y brazo fueron mucho menores, lo que indica que tanto Cd como Fe, Cu y Zn son acumulados preferentemente en la glándula digestiva. Esto concuerda con otros informes, en donde la glándula digestiva de varias especies de cefalópodos muestra una acumulación considerablemente mayor de metales que músculo, corazones branquiales, branquias, sistema digestivo, riñón, sistema genital, piel y concha (Miramand y Guary, 1980; Miramand y Bentley, 1992). Con base en las concentraciones de Cd y el peso de los tejidos de pulpo y sepia de ambas zonas, se puede concluir que más de 90% del Cd de todo el cuerpo es acumulado en la glándula digestiva. Esta estimación, que concuerda con los cálculos presentados en otros estudios (Bustamante, 1998; Bustamante *et al.*, 2002), enfatiza la capacidad de la glándula digestiva para acumular el Cd. Aunque ya se había observado esta capacidad en cefalópodos de zonas

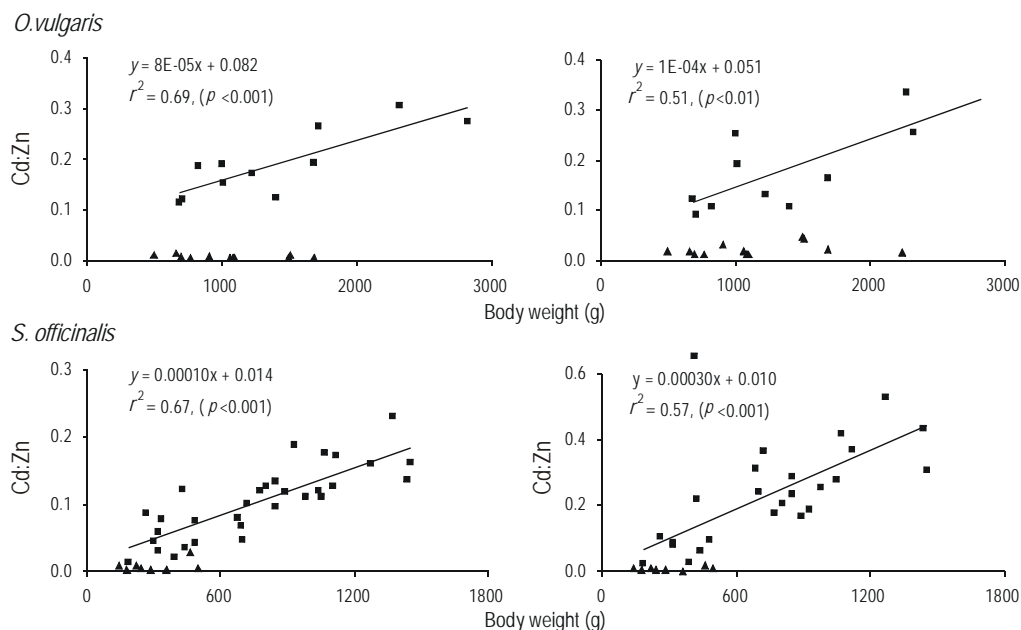


Figure 4. Ratios of Cd:Cu and Cd:Zn in the digestive gland (molar basis) vs body weight (g) of *Octopus vulgaris* and *Sepia officinalis* from sites A (■) and B (▲).

Figura 4. Razones Cd:Cu y Cd:Zn en la glándula digestiva (base molar) vs el peso corporal (g) de *Octopus vulgaris* y *Sepia officinalis* de las zonas A (■) y B (▲).

The relationship between metal concentrations and body weight was rarely found for mantle and arm. This lack of relationship was also observed for Zn, Cu and Cd in other octopus species (Bustamante *et al.*, 1998). In the case of the digestive gland of octopus and cuttlefish, negative correlations between metal concentration and body weight were more recurrent at site A for Zn and Cu. A positive relationship was also found between the Cd in the digestive gland and the body weight of octopus at site A, where exposure to higher levels of Cd is considered. This reinforces the key function of the digestive gland in the accumulation and/or detoxification of Cd. In these type of mechanisms, similarities in chemical behaviour based on electron configuration between Cd and essential elements like Zn and Cu may be significant (Smith *et al.*, 1984; Miramand and Bentley, 1992). In order to examine the sequestration of Cd in the digestive gland with individual growth and its interaction with Zn and Cu, ratios of Cd:Zn and Cd:Cu (on molar basis) were plotted against body weight (fig. 4). Two clear-cut aspects may be discerned: the digestive gland of octopus and cuttlefish from site A (contaminated site) exhibited Cd:Zn ratios (median 0.19 and 0.11 nmol g⁻¹, respectively) and Cd:Cu ratios (median 0.15 and 0.23 nmol g⁻¹, respectively) one to two orders of magnitude higher than Cd:Zn ratios (median 0.0067 and 0.019 nmol g⁻¹, respectively) and Cd:Cu ratios (median 0.0043 and 0.0058 nmol g⁻¹, respectively) from site B; both Cd:Zn and Cd:Cu ratios of site A increased linearly with growth. This increase suggests that Cd was progressively sequestered in the digestive gland of cephalopods, possibly competing with Zn and Cu for the binding-sites of the molecular structures. In

ligeramente contaminadas (Bustamante *et al.*, 1998), los niveles superiores de Cd en la glándula digestiva de especies capturadas en áreas contaminadas (Bustamante *et al.*, 2000) indican que la acumulación en este órgano también está relacionada con el medio ambiente.

Los niveles de Cd en la glándula digestiva y en los tejidos musculares de pulpo y sepia de la costa noroccidental (zona A) fueron un orden de magnitud mayores que los de la costa del sur (zona B). Este contraste parece estar relacionado con las diferencias en la disponibilidad de Cd en el agua de ambas zonas. De hecho, estudios realizados en 2000 y 2001 sobre la calidad del agua en las costas portuguesas registraron concentraciones de Cd mayores en las aguas de la costa noroccidental que en las de la costa sur (Caetano y Vale, 2003). En vista de que los pulpos y las sepias poseen hábitos sedentarios (Boletzky, 1983; Mangold, 1983), cabe suponer que los especímenes capturados en la zona A están expuestos a niveles de Cd más elevados durante sus vidas que los de la zona B. Por tanto, una acumulación mayor de Cd en la glándula digestiva de los especímenes de la zona A parece reflejar esta exposición ambiental; sin embargo, los mayores valores encontrados en el manto y los brazos indican que la capacidad de este órgano para acumular el Cd no evitó su transferencia a los tejidos musculares.

Raramente se encontró relación entre las concentraciones de metales y el peso corporal entre manto y brazo. Esta falta de relación también se observó para Zn, Cu y Cd en otras especies de pulpo (Bustamante *et al.*, 1998). En el caso de la glándula digestiva del pulpo y la sepia, las correlaciones negativas entre concentraciones de metales y peso corporal fueron más

contrast, the metal ratios in the mantle and arm were not related to body weight, as a result of the high Cd storage capacity of the digestive gland.

Acknowledgements

The authors wish to thank our colleagues João Pereira, Pedro da Conceição, Manuel Sobral and Isabel Sobral, and the anonymous reviewers for their helpful comments to improve the manuscript. This work was supported by the FCT Project PLE-14 and the QCA III Project-MARE, 22-05-05-FDR-00005.

References

- Bebianno, M.J. and Langston, W.J. (1991). Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Mar. Biol.*, 108: 91–96.
- Boletzky, S.V. (1983). *Sepia officinalis*. In: P.R. Boyle (eds.), *Cephalopod Life Cycles, Species Accounts*. Vol. I. Academic Press, UK, pp. 335–364.
- Bustamante, P. (1998). Etude des processus de bioaccumulation et de détoxification d'éléments traces (métaux lourds et terres rares) chez les mollusques céphalopodes et bivalves pectinidés. Implication de leur biodisponibilité pour le transfert vers les prédateurs. Thesis, University of La Rochelle, pp. 290.
- Bustamante, P., Cherel, Y., Caurant, F. and Miramand, P. (1998). Cadmium, copper and zinc in octopus from Kerguelen Islands, Southern Indian Ocean. *Polar Biol.*, 19: 264–271.
- Bustamante, P., Grigioni, S., Boucher-Rodoni, R., Caurant, F. and Miramand, P. (2000). Bioaccumulation of 12 trace elements in the tissues of *Nautilus Nautilus macromphalus* from New Caledonia. *Mar. Pollut. Bull.*, 40(8): 688–696.
- Bustamante, P., Cosson, R.P., Gallien, I., Caurant, F. and 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. and Vale, C. (2003). Trace-elemental composition of seston and plankton along the Portuguese coast. *Acta Oecol.*, 24: S341–S349.
- Castillo, L.V., Kawagushi, S. and Maita, Y. (1990). Evidence for the presence of heavy metal binding proteins in the squid, *Onychoteuthis borealijaponica*. In: R. Hirano and I. Hanyu (eds.), *The Second Asian Fisheries Forum*. Manila: Asian Fish. Soc., pp. 991.
- Ferreira, A.M., Cortesão, C., Castro, O. and Vale, C. (1990). Accumulation of metals and organochlorines in tissues of the oyster *Crassostrea angulata* from the Sado estuary. *Sci. Total Environ.*, 97/98: 627–239.
- Finger, J.M. and Smith, J.D. (1987). Molecular association of Cu, Zn, Cd and ²¹⁰Po in the digestive gland of the squid *Nototodarus gouldi*. *Mar. Biol.*, 95: 87–91.
- Journal of EU Communities (2001). Resolution No. 466/2001, pp. 1–13.
- Langston, W.J., Bebianno, M.J. and Burt, G.R. (1998). Metal handling strategies in molluscs. In: W.J. Langston and M.J. Bebianno (eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, UK, pp. 220–283.
- Mangold, K. (1983). *Octopus vulgaris*. In: P.R. Boyle (eds.), *Cephalopod Life Cycles, Species Accounts*. Vol. I. Academic Press, UK, pp. 335–364.
- Martin, J.H. and Flegal, A.R. (1975). High copper concentrations in squid livers in association with elevated levels of silver, cadmium and zinc. *Mar. Biol.*, 30: 51–55.
- recurrentes en la zona A para Zn y Cu. También se encontró una relación positiva entre Cd en la glándula digestiva y el peso corporal de pulpo de la zona A, donde existe una exposición considerablemente mayor a elevadas concentraciones de Cd. Esto refuerza la función esencial de la glándula digestiva en la acumulación y/o detoxificación de Cd. En este tipo de mecanismos, las similitudes en el comportamiento químico de Cd y elementos esenciales como Zn y Cu, debidas a la configuración electrónica, pueden ser significativas (Smith *et al.*, 1984; Miramand y Bentley, 1992). Para examinar la acumulación de Cd en la glándula digestiva contra crecimiento y su interacción con Zn y Cu, se graficaron las razones de Cd:Zn y Cd:Cu (con base molar) *versus* el peso corporal (fig. 4). Se pueden distinguir dos aspectos muy claros: las glándulas digestivas de pulpo y sepia de la zona A (localidad contaminada) mostraron razones de Cd:Zn (mediana 0.19 y 0.11 nmol g⁻¹, respectivamente) y Cd:Cu (mediana 0.15 y 0.23 nmol g⁻¹, respectivamente) una o dos órdenes de magnitud superiores que las razones Cd:Zn (mediana 0.0067 y 0.019 nmol g⁻¹, respectivamente) y Cd:Cu (mediana 0.0043 y 0.0058 nmol g⁻¹, respectivamente) de la zona B; ambas razones, Cd:Zn y Cd:Cu, de las muestras de la zona A se incrementaron linealmente con el crecimiento. Este aumento sugiere que el Cd fue acumulado progresivamente en la glándula digestiva de los cefalópodos, posiblemente compitiendo con el Zn y Cu por los puntos de unión de las estructuras moleculares. En contraste, como consecuencia del gran almacenamiento de Cd en la glándula digestiva, no se encontró relación entre las razones de metales para el manto y el peso corporal.

Agradecimientos

Los autores agradecen a sus colegas João Pereira, Pedro da Conceição, Manuel Sobral e Isabel Sobral, así como a los revisores anónimos sus comentarios que mejoraron el manuscrito. Este trabajo fue financiado por el proyecto PLE-14 de la FCT y por el proyecto QCA III-MARE, 22-05-01-FDR-00005.

Traducido al español por Christine Harris.

- Miramand, P. and Guary, J.C. (1980). High concentrations of some heavy metals in tissues of the Mediterranean octopus. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 24: 783–788.
- Miramand, P. and 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.
- Rainbow, P.S., Phillips, D.J.H. and Depledge, M.H. (1990). The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. A need for laboratory investigation of accumulation strategies. *Mar. Pollut. Bull.*, 21(7): 321–324.
- Smith, J.D., Plues, L., Heyraud, M. and Cherry, R.D. (1984). Concentrations of the elements Ag, Al, Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb and Zn, and the radionuclides ²¹⁰Pb and ²¹⁰Po in the digestive gland of the squid *Notodarus gouldi*. *Mar. Environ. Res.*, 13: 55–68.

- Tanaka, T., Hayahi, Y. and Ishizawa, M. (1983). Subcellular distribution and binding of heavy metals in the untreated liver of the squid, comparison with data from the livers of cadmium and silver exposed rats. *Experientia*, 39: 746–748.
- Vale, C., Ferreira, A.M., Cortesão, C., Castro, O.G. and Mendes, M.C. (1985). A mussel watch in the Portuguese coast: 1984. ICES, C.M. 1985/E: pp. 18.
- Viarengo, A. and Nott, J.A. (1993). Mini-review. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104C: 355–372.
- Zauke, G.P. and Petri, G. (1993). Metal concentrations in Antarctic crustacean: The problem of background levels. In: R. Dallinger and P.S. Rainbow (eds.), *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*. Lewis, London, pp. 73–101.