

## FARMACOCINÉTICA DEL ZINC EN RATAS MEDIANTE BOOTSTRAP

Géomar Acuña<sup>1</sup>, Hugo J. Amelo<sup>2</sup>, Leyanis Rodríguez<sup>1</sup>, Niurys de Castro<sup>1</sup>, Gerardo Rodríguez<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Universidad de La Habana.

<sup>2</sup> Centro Nacional de Biopreparados (BioCen).

<sup>3</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales (IMRE), Universidad de La Habana.

A quién dirigir correspondencia: MSc. Géomar Acuña, email: [geomarac@ifal.uh.cu](mailto:geomarac@ifal.uh.cu)

### Resumen

La realización de un estudio farmacocinético, usualmente requiere la colección de un gran número de muestras, generalmente de sangre total, plasma o suero. El muestreo de un punto mediante punción del plexo ocular en ratas es uno de los métodos disponibles para estos fines pero dificulta el procesamiento de los datos. Recientemente, se propuso un método de remuestreo o bootstrap útil en estos casos. En el presente trabajo se utilizó el mencionado método para caracterizar la farmacocinética del Zn administrado como sulfato a ratas. Se administró una dosis intragástrica de sulfato de zinc heptahidratado (3.41 mg Zn/kg) a ratas Wistar y se colectaron muestras sanguíneas mediante punción del plexo ocular hasta las 6 horas post-administración. De cada rata se obtuvo una muestra (muestreo de un punto). Las concentraciones séricas de zinc se determinaron mediante espectrometría de absorción atómica y los datos experimentales se procesaron mediante bootstrap: se generaron grupos de 10, 100, 500 o 1000 pseudoperfiles farmacocinéticos, por triplicado en cada caso, utilizando números aleatorios y permitiendo reemplazos, y se estimaron parámetros farmacocinéticos por análisis no compartimental. El análisis de los coeficientes de variación interréplicas para las medias y las desviaciones estándares demostró que el método es más exacto y preciso para 1000 pseudo-perfiles generados. Los valores estimados de tiempo de vida media ( $6.59 \pm 1.6$  h), concentración máxima ( $3.014 \pm 0.4$  mg/L) y tiempo máximo ( $0.50 \pm 0.3$  h) fueron similares a los reportados por otros autores. Se concluyó que el método es reproducible y confiable, y que puede ser empleado en estudios farmacocinéticos posteriores, en los que nuestro grupo está inmerso.

**Palabras clave:** farmacocinética, muestreo de un punto, remuestreo, bootstrap, sulfato de zinc

## PHARMACOKINETICS OF ZINC IN RATS BY BOOTSTRAP

### Abstract.

A pharmacokinetic study usually requires the collection of a great number of samples, generally blood, plasma or serum. The one-point sampling by puncture of the ocular plexus of rats is one of the available methods to achieve this goal but the handling of data obtained by one-point sampling is difficult. Recently, a resampling or bootstrap method useful in these cases was proposed. In the present paper, such a method was used to characterize the pharmacokinetic of Zn administered as

sulfate to Wistar rats. An intragastric dose of zinc sulfate (3.41 mg Zn/kg) was administered to Wistar rats and blood samples were collected by puncture of the ocular plexus until 6 h after the administration. One sample was collected from each rat (one-point sampling). The zinc serum concentrations were determined by atomic absorption spectrometry and the experimental data were processed by bootstrap: groups of 10, 100, 500 or 1000 pseudo-pharmacokinetic profiles were generated, each one by triplicate, using random numbers and permitting replacements, and pharmacokinetic parameters were estimated by non-compartmental analysis. The analysis of coefficients of variation among replicates for the means and standard deviations showed that the method is more accurate and precise when 1000 pseudo-pharmacokinetic profiles are generated. The estimated values of half-life ( $6.59 \pm 1.6$  h), maximum concentration ( $3.014 \pm 0.4$  mg/L) and time to maximum concentration ( $0.50 \pm 0.3$  h) were similar to those reported by other authors. It was concluded that the method is reliable and that it can be used in future pharmacokinetic studies in which our group is immersed.

**Keywords:** pharmacokinetics, one-point sampling, resampling, bootstrap, zinc sulfate.

### Introducción

La realización de un estudio farmacocinético, usualmente requiere la colección de un gran número de muestras, generalmente de sangre total, plasma o suero. El procedimiento de colección de muestras resulta relativamente sencillo en ensayos clínicos y en ensayos preclínicos con animales grandes, donde el acceso al compartimento vascular resulta fácil. Cuando se utilizan ratas o ratones en tales estudios, los procedimientos de colección de muestras suelen ser más invasivos y complejos. En el caso específico de las ratas, las muestras sanguíneas pueden obtenerse mediante punción del plexo ocular; de la cola (por punción de una vena o una arteria o por amputación de un pequeño segmento); directamente del corazón; por canulación de algunas arterias y venas como la aorta abdominal, la vena cava o la yugular; y por decapitación<sup>[1]</sup>.

El método de punción del plexo ocular es uno de los más sencillos pero su uso dificulta la obtención de grandes números de muestras de un mismo animal. Una posible alternativa radica en el método de muestreo de un punto (one-point sampling) que consiste en obtener una muestra de 3 o 4 animales a los mismos tiempos después de la administración. Al emplear este método, no es posible obtener un perfil farmacocinético de concentración en función del tiempo para cada animal sino un perfil farmacocinético medio que permite estimar los diferentes parámetros farmacocinéticos pero sin estadísticos de dispersión, como desviación estándar o coeficiente de variación, lo cual impide la comparación estadística, imprescindible en la mayoría de los estudios<sup>[2]</sup>.

Para resolver este problema, es posible utilizar un método de remuestreo (resampling) o bootstrap<sup>[3]</sup> que agrupa un conjunto de técnicas de simulación computacional en las que diferentes muestras se

seleccionan aleatoriamente a partir de los datos contenidos en una muestra real, extraída de una población real. Este método solo asume que la muestra fue aleatoriamente extraída de la población y por tanto, que es representativa de ella. Cuando se utiliza el bootstrap, no se hace ninguna suposición acerca de la distribución de la población de la cual la muestra fue extraída, ni de la muestra misma. En lugar de eso, la muestra extraída de la población real es tratada como una población y muestras repetidas se toman de ella (remuestreo), mediante el uso de simulación computacional<sup>[4]</sup>. El uso más difundido de este método es la modelación computacional donde se utiliza como una de las herramientas que permiten validar los modelos *in silico* obtenidos<sup>[5]</sup>.

Una variante de este método, particularmente útil en estudios farmacocinéticos con muestreo de un punto, fue propuesta por Takemoto y cols.,<sup>[2]</sup>. En el presente trabajo se utilizó ese método para caracterizar la farmacocinética del zinc administrado como sulfato a ratas Wistar. Los resultados obtenidos demuestran la reproducibilidad y confiabilidad del método y justifican su uso en estudios posteriores.

### **Materiales y métodos**

#### Materiales.

El sulfato de zinc heptahidratado, el éter anestésico y el ácido nítrico fueron obtenidos del stock de reactivos de los laboratorios del Centro de Evaluaciones e Investigaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana.

El resto de los reactivos utilizados fueron de calidad analítica, y obtenidos de fuentes comerciales.

#### Diseño experimental.

Todos los procedimientos experimentales con animales fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana.

Ratas Wistar adultas (peso promedio  $240 \pm 20$  g), provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (Cempalab), fueron alojadas en depósitos estándares y se les permitió el acceso *ad libitum* al agua y los alimentos durante todo el tiempo que duraron los experimentos, excepto durante un período de 12 horas antes, y 2 horas después de la administración, durante el cual las ratas se mantuvieron en condiciones de ayuno.

Se utilizaron en total 24 ratas, las que se dividieron aleatoria y equitativamente en 8 grupos. Todas las ratas recibieron una dosis intragástrica de 15 mg/kg de sulfato de zinc heptahidratado (3.41 mg Zn/kg) preparado como solución acuosa (5 mg/mL), excepto las 3 ratas del grupo 1 que se utilizaron como control para determinar los niveles basales de zinc. Posterior a la administración, las ratas fueron sedadas mediante inhalación de éter anestésico y de cada una se colectó una muestra de sangre mediante punción del plexo ocular con tubos capilares de vidrio. Las muestras se colectaron a tiempo 0, antes de la administración (grupo 1), 5 minutos (grupo 2), 15 minutos (grupo 3), 30 minutos (grupo

4), 45 minutos (grupo 5), 1 hora (grupo 6), 3 horas (grupo 7) y 6 horas (grupo 8). Inmediatamente después de la colección de muestras, las ratas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical.

A partir de las muestras de sangre colectadas se separó la fracción sérica mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos. Las muestras de suero fueron trasvasadas a sendos tubos colectores adecuadamente rotulados, y refrigeradas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior cuantificación.

#### Cuantificación de los niveles séricos de zinc.

Los niveles séricos de zinc fueron determinados mediante espectrometría de absorción atómica. Las muestras a analizar fueron preparadas de la siguiente forma: 100  $\mu\text{L}$  de suero fueron mezclados con 5 mL de ácido nítrico (60 %) y calentados a  $100^{\circ}\text{C}$  hasta que el volumen se redujo a menos de 2 mL. El volumen remanente se diluyó en agua desionizada a temperatura ambiente.

De forma similar se prepararon soluciones estándares para la construcción de una curva de calibración entre 0 y 1 mg/L.

#### Procesamiento de los datos.

A partir de los datos escasos de concentración sérica en función del tiempo, se generaron 10, 100, 500, o 1000 pseudo-perfiles farmacocinéticos, por triplicado en cada caso, utilizando el método de bootstrap propuesto por Takemoto y colaboradores [2].

El método consiste en seleccionar uno de los tres valores de concentración sérica disponibles para cada tiempo utilizando números aleatorios para construir los pseudo-perfiles farmacocinéticos.

Para cada pseudo-perfil generado, se determinaron los siguientes parámetros farmacocinéticos mediante análisis no compartimental: pendiente de la fase terminal del perfil semilogarítmico de concentración sérica en función del tiempo ( $\lambda_z$ ), mediante regresión lineal; tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2\lambda}$ ) mediante la fórmula  $t_{1/2\lambda} = 0.693/\lambda_z$ ; área bajo la curva ( $AUC_{0-t}$ ) mediante el método de los trapecios; área bajo la curva extrapolada hasta el infinito ( $AUC_{inf}$ ) mediante la fórmula  $AUC_{inf} = AUC_{0-t} + C_z/\lambda_z$ , donde  $C_z$  es la última concentración sérica determinada; concentración máxima ( $C_{max}$ ) y tiempo máximo ( $T_{max}$ ) por inspección directa de los pseudo-perfiles generados.

Con el objetivo de determinar la reproducibilidad del método de remuestreo empleado, éste se repitió 3 veces y, utilizando los valores medios para cada parámetro estimado en cada réplica, se calcularon los respectivos coeficientes de variación. De forma similar se procedió con las desviaciones estándares.

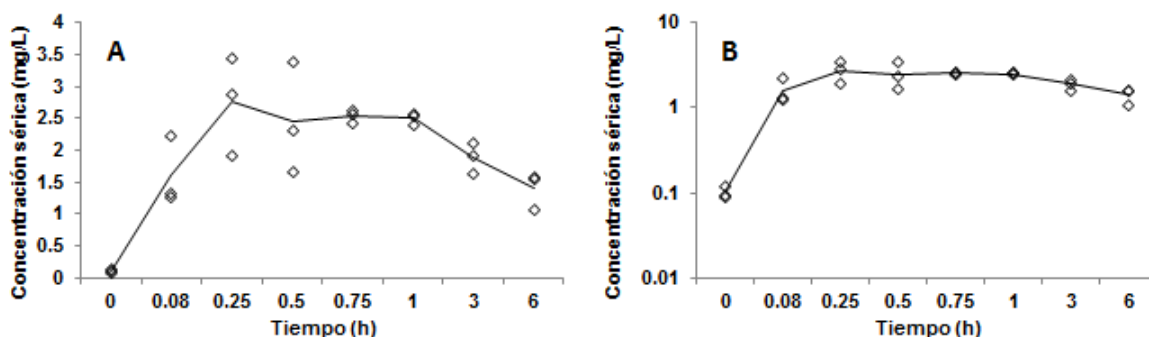
Los resultados se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Todos los cálculos se realizaron en Microsoft Office Excel 2010.

## **Resultados**

En el presente trabajo de caracterización farmacocinética del zinc administrado en forma de sulfato a ratas Wistar, se empleó una metodología de colección de muestras sanguíneas (muestreo de un punto) que impide la determinación de valores medios y desviaciones estándares para los parámetros farmacocinéticos estimados de la forma que se hace en los estudios farmacocinéticos más tradicionales. Por esta razón, aunque es posible reportar los valores estimados para los diferentes parámetros farmacocinéticos, no se puede obtener ninguna información sobre la dispersión de estos valores, lo cual incide, de manera más directa, en el procesamiento estadístico de los datos.

Recientemente, Takemoto y colaboradores [2] propusieron un método de remuestreo o bootstrap que permite generar computacionalmente varios pseudo-perfiles farmacocinéticos a partir de los datos experimentales de concentración en función del tiempo obtenidos en estudios farmacocinéticos que emplean la técnica de muestreo de un punto. En el presente estudio se utilizó el mencionado método para realizar la caracterización farmacocinética.

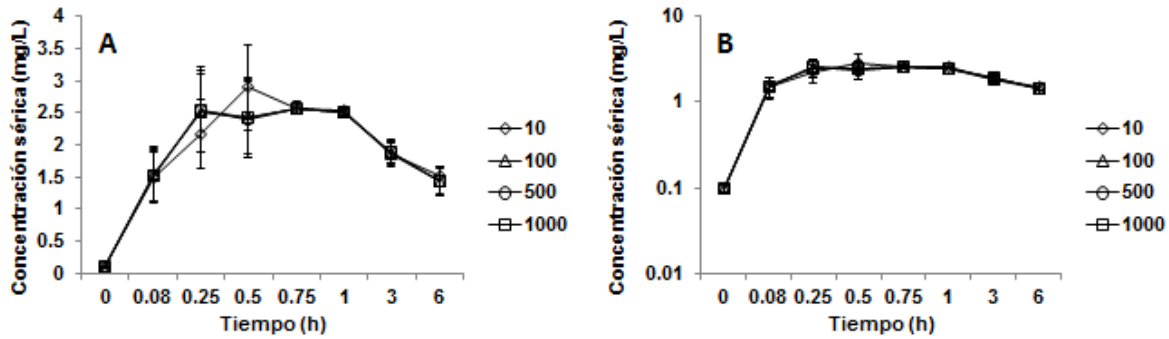
En la figura 1 se muestran los datos experimentales de concentración sérica en función del tiempo.



**Fig. 1.** Datos experimentales de concentración sérica en función del tiempo obtenidos mediante muestreo de un punto después de la administración de una dosis intragástrica de 3.41 mg Zn/kg a ratas Wistar. Los rombos indican los valores puntuales de concentración y las líneas continuas representan los perfiles farmacocinéticos medios. Los datos se muestran en escala normal (A) y semilogarítmica (B).

Los valores de concentración obtenidos a tiempo 0 (inmediatamente antes de la administración), indican los niveles basales de zinc ( $0.10 \pm 0.016$  mg/L). Yasuno y cols., [6] reportaron valores que oscilan entre aproximadamente 500 y 1000 ng/mL para el zinc endógeno en ratas Wistar.

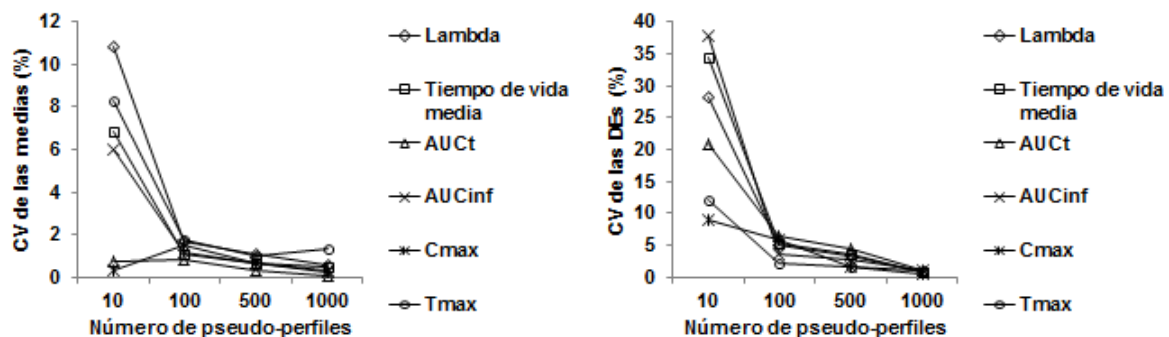
En la figura 2 se muestran los pseudo-perfiles farmacocinéticos medios obtenidos después de generar 10, 100, 500 y 1000 pseudo-perfiles farmacocinéticos a partir de los datos experimentales, mediante la técnica de remuestreo propuesta por Takemoto y cols. [2]



**Fig. 2.** Pseudo-perfiles farmacocinéticos medios ( $\pm$  DE) obtenidos después de generar los números de pseudo-perfiles indicados en las leyendas mediante bootstrap a partir de los datos experimentales de concentración sérica en función del tiempo. Los datos se presentan en escala normal (A) y semilogarítmica (B).

Se observó una notable variabilidad del pseudo-perfil medio obtenido después de generar 10 pseudo-perfiles con respecto a los pseudo-perfiles medios obtenidos después de generar 100, 500 o 1000 pseudo-perfiles, lo que indica que al incrementar el número de pseudo-perfiles generados, se reduce la variabilidad. La desviación estándar asociada al valor de concentración determinado a tiempo 0 (inmediatamente antes de la administración) es prácticamente nula, lo que sugiere una gran homogeneidad en los niveles basales de zinc de los animales utilizados. Sin embargo, las desviaciones estándares asociadas a los puntos correspondientes a los tiempos 5, 15 y 30 minutos (0.08, 0.25 y 0.5 horas, respectivamente) fueron notablemente mayores que las asociadas al resto de los puntos, lo que pudiera estar determinado por la variabilidad interindividual en la cinética de absorción gastrointestinal del zinc.

Con el objetivo de comprobar la reproducibilidad del método de remuestreo empleado, cada grupo de pseudo-perfiles (10, 100, 500, y 1000) se generó por triplicado y para cada réplica se determinó el valor medio y la desviación estándar de cada parámetro farmacocinético estimado. En la figura 3 se muestran los coeficientes de variación calculados utilizando los tres valores medios y los tres valores de desviación estándar obtenidos para cada grupo de pseudo-perfiles generados.



**Fig. 3.** Coeficientes de variación interréplica calculados para los valores medios y las desviaciones estándares de los parámetros estimados.

Los valores de coeficiente de variación calculados para las medias de los parámetros estimados en cada réplica del procedimiento de bootstrap disminuyeron desde valores de 6 % o más, cuando se generaron 10 pseudo-perfiles, hasta menos de 2 % cuando se generaron 100, 500 o 1000 pseudo-perfiles, exceptuando los parámetros concentración máxima ( $C_{max}$ ) y área bajo la curva ( $AUC_{0-t}$ ), para los cuales se observaron coeficientes de variación interréplica por debajo del 2 % independientemente del número de pseudo-perfiles generados. Estos resultados indican que el procedimiento de bootstrap empleado se hace más exacto a medida que se incrementa el número de pseudo-perfiles generados.

Por otra parte, los coeficientes de variación calculados con los valores de desviación estándar obtenidos en cada réplica para cada número de pseudo-perfiles generados, disminuyeron desde alrededor de 10 % o más para un número de 10 pseudo-perfiles generados, hasta menos de 5 % cuando se generaron 100, 500 o 1000 pseudo-perfiles, lo que indica que el procedimiento de bootstrap empleado se hace más preciso a medida que se incrementa el número de pseudo-perfiles generados. En la tabla 1 se muestran los valores (media  $\pm$  DE) de los parámetros farmacocinéticos estimados para un número de 1000 pseudo-perfiles generados.

**Tabla 1.** Parámetros farmacocinéticos estimados después de generar 1000 pseudo-perfiles mediante bootstrap.

	Media $\pm$ DE		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
$\lambda_z$ [h <sup>-1</sup> ]	0.11 $\pm$ 0.035	0.11 $\pm$ 0.034	0.11 $\pm$ 0.035
$\frac{t_1}{2\lambda}$ [h]	6.59 $\pm$ 1.55	6.64 $\pm$ 1.55	6.58 $\pm$ 1.57
$AUC_{0-t}$ [mg $\times$ h/L]	11.71 $\pm$ 0.60	11.69 $\pm$ 0.59	11.69 $\pm$ 0.60
$AUC_{inf}$ [mg $\times$ h/L]	25.80 $\pm$ 5.016	25.92 $\pm$ 4.97	25.75 $\pm$ 5.074
$C_{max}$ [mg/L]	3.014 $\pm$ 0.39	3.0012 $\pm$ 0.39	3.011 $\pm$ 0.38
$T_{max}$ [h]	0.50 $\pm$ 0.25	0.51 $\pm$ 0.26	0.50 $\pm$ 0.25

### Discusión

En el presente trabajo se reporta la caracterización farmacocinética, mediante bootstrap, del zinc administrado en forma de sulfato a ratas Wistar.

Después de administrar dosis intragástricas de 3.41 mg Zn/kg, se colectaron muestras sanguíneas mediante muestreo de un punto hasta las 6 horas y se construyó un perfil farmacocinético medio utilizando los valores medios de los datos escasos de concentración sérica en función del tiempo

obtenidos experimentalmente (figura 1). Puesto que resulta imposible conocer la dispersión de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de un perfil farmacocinético medio, se decidió utilizar el procedimiento de remuestreo o bootstrap propuesto por Takemoto y colaboradores [2].

Para determinar el número óptimo de pseudo-perfiles farmacocinéticos a generar, se realizó la caracterización farmacocinética del zinc después de generar 10, 100, 500 o 1000 pseudo-perfiles por triplicado (figura 2) y se calculó el coeficiente de variación para los valores medios y los valores de desviación estándar de cada parámetro estimado utilizando los valores medios y los correspondientes valores de desviación estándar calculados en cada réplica para cada número de pseudo-perfiles generados.

El análisis de los coeficientes de variación calculados arrojó que la mayor variabilidad en los resultados de la caracterización farmacocinética del zinc se obtuvo después de generar 10 pseudo-perfiles. En este caso, los valores de los coeficientes de variación calculados para los tres valores medios de los parámetros  $\lambda_z$ ,  $t_{1/2\lambda}$ ,  $AUC_{inf}$  y  $Tmax$ , fueron 10.84 %, 6.86 %, 6.033 % y 8.25 %, respectivamente. Los coeficientes de variación calculados para los parámetros  $AUC_{0-t}$  (0.75 %) y  $C_{max}$  (0.32 %), fueron notablemente menores. Los respectivos coeficientes de variación calculados para los tres valores medios de estos dos parámetros se mantuvieron bajos independientemente del número de pseudo-perfiles generados: 0.78 % y 1.53 % (100 pseudo-perfiles), 0.29 % y 0.62 % (500 pseudo-perfiles), 0.10 % y 0.22 % (1000 pseudo-perfiles). Sin embargo, los valores de coeficiente de variación calculados para el resto de los parámetros exhibieron una brusca disminución entre 10 y 100 pseudo-perfiles generados y una disminución menos marcada entre 100 y 1000 pseudo-perfiles generados. De manera que el coeficiente de variación calculado para los tres valores medios de todos los parámetros estimados después de generar 1000 pseudo-perfiles alcanzó el valor mínimo. Esto indica que la generación de 1000 pseudo-perfiles mediante bootstrap, permitió caracterizar la farmacocinética del zinc de manera suficientemente exacta.

Los coeficientes de variación calculados para los tres valores de desviación estándar obtenidos para cada número de pseudo-perfiles generados mostró un comportamiento similar, por lo que se concluyó que el número de 1000 pseudo-perfiles generados también permitió caracterizar la farmacocinética del zinc de forma suficientemente precisa.

Probablemente, la generación de un mayor número de pseudo-perfiles, hubiera significado una mejora (insignificante) en la precisión y la exactitud del procedimiento; aunque a expensas de un (injustificado) incremento de la explotación de recursos computacionales.

En la tabla 1 se reportan los parámetros farmacocinéticos estimados (media  $\pm$  DE) después de generar 1000 pseudo-perfiles. Los valores estimados para la constante de velocidad de eliminación ( $\lambda_z = 0.11 \pm 0.035 \text{ h}^{-1}$ ) y el tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2\lambda} = 6.59 \pm 1.55 \text{ h}$ ) son similares a

los reportados por otros autores. Por ejemplo, Zhang y colaboradores, reportaron un tiempo de vida media de 7.93 horas (análisis no compartimental) después de administrar una dosis oral de 4 mg Zn/kg a ratas Wistar <sup>[7]</sup>. Yasuno y cols., reportaron un valor de tiempo de vida media (modelación bicompartimental) de aproximadamente 1 hora después de administrar una dosis intravenosa de 50 µg <sup>68</sup>Zn/kg a ratas Wistar <sup>[6]</sup>. La marcada diferencia entre el valor de tiempo de vida media reportado por Yasuno y cols., y el nuestro puede atribuirse a las diferentes vías de administración utilizadas y al hecho de que ellos administraron un isótopo de zinc (<sup>68</sup>Zn) diferente al que mayoritariamente se encuentra en la naturaleza (<sup>66</sup>Zn), de modo que pudieron caracterizar la farmacocinética del metal de forma totalmente libre de la influencia del zinc endógeno.

Los valores estimados de concentración máxima ( $C_{max} = 3.014 \pm 0.39$  mg/L) y tiempo máximo ( $T_{max} = 0.5 \pm 0.25$  h) también son similares a los reportados por otros autores. Yasuno y cols., reportaron valores de 0.7 h y 1.3 h al administrar dosis de <sup>68</sup>ZnSO<sub>4</sub> equivalentes a 1 mg <sup>68</sup>Zn/kg y 5 mg <sup>68</sup>Zn/kg, respectivamente, lo que denota la dosis-dependencia de la velocidad de absorción gastrointestinal de zinc <sup>[6]</sup>. En cuanto a la concentración máxima, Zhang y cols., reportaron un valor de 3 mg/L después de administrar una dosis oral de 4 mg Zn/kg a ratas Wistar <sup>[7]</sup>.

La similitud de los valores estimados para los parámetros farmacocinéticos en nuestro trabajo con respecto a los reportados por otros autores, confirma la confiabilidad del procedimiento de bootstrap empleado.

En conclusión, los resultados presentados demuestran la reproducibilidad y confiabilidad del procedimiento de remuestreo o bootstrap empleado y justifican su uso en estudios posteriores en los que nuestro grupo se encuentra inmerso actualmente.

### Referencias bibliográficas

- 1 Johnson MD, Gad SC. The rat. In: Gad SC editor. Animal models in toxicology; 2007.
- 2 Takemoto S, Yamaoka K, Nishikawa M, Takamura Y. Histogram analysis of pharmacokinetic parameters by bootstrap resampling from one-point sampling data in animal experiments. Drug Metab Pharmacokinet 2006; 21 (6): 458-64.
- 3 Shao J. The bootstrap. Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics 2003; 1 (1): 127-32.
- 4 Bolton S, Bon C. Computer-intensive methods. In: Swarbrick J editor. Pharmaceutical statistics Practical and clinical applications. New York; 2010.
- 5 Fujiwara S, Yamashita F, Hashida M. QSAR Analysis of Interstudy Variable Skin Permeability Based on the "Latent Membrane Permeability" Concept. J Pharm Sci 2003; 92: 1939-46.
- 6 Yasuno T, Okamoto H, Nagai M, Kimura S, Yamamoto T, Nagano K, *et al.* The disposition and intestinal absorption of zinc in rats. Eur J Pharm Sci 2011; 44 (3): 410-5. eng.

- 7 Zhang S, Zhang Y, Peng N, Zhang H, Yao J, Li Z, *et al.* Pharmacokinetics and biodistribution of zinc-enriched yeast in rats. *ScientificWorldJournal* 2014; 2014: 217142. eng.