

## Sisteme carrier pentru moleculele antifungice

VALENTIN NĂSTASĂ <sup>\*1</sup>, ALINA ȘTEFANACHE <sup>2</sup>, CĂTĂLINA STAN <sup>3</sup>

1) Departamentul de Farmacologie al USAMV «Ion Ionescu de la Brad», Iași-Romania

2) Departamentul de Chimie Generală și Anorganică al UMF «Gr. T. Popa», Iași-

Romania 3) Departamentul de Industria Medicamentului al UMF «Gr. T. Popa», Iași-Romania

Primit (Received): 27.03.2007 / Acceptat (Accepted) : 04.04.2007

## Carrier systems for the antifungal molecules

Majoritatea moleculelor antifungice sunt insolubile în mediu apos, ceea ce reprezintă o problemă majoră în transportul și absorbția substanțelor active. În plus, acestea prezintă o toxicitate ridicată față de structurile proprii ale organismului (atât la nivel hepatic cât și renal). De aceea este necesară folosirea unor molecule *carrier* care pot înlătura aceste neajunsuri, conducând în consecință la creșterea biodisponibilității antifungicelor în focar și diminuarea efectelor adverse. Cele mai utilizate sisteme *carrier* sunt reprezentate de lipozomi, ciclodextrine și nanoparticule.

**Cuvinte cheie:** antifungice, sisteme carrier, lipozomi, nanoparticule, ciclodextrine

In most cases, the antifungal molecules are not soluble in water and that fact represents a major problem in the absorption and spreading of the active substances. Further, these molecules exhibit a high toxicity toward self structures of the host organisms, both at hepatic and renal level. That's why, the use of some carrier molecules which may eliminate these difficulties, improving concomitantly the bioavailability of antifungals in target sites and reducing the adverse reactions, is imperative. The most suitable carrier systems comprise the liposomes, nanoparticles and cyclodextrins.

**Keywords:** antifungals, carrier systems, liposomes, nanoparticles, cyclodextrins

Incidența crescută a infecțiilor fungice și dificultățile terapeutice care survin în special în cazul celor invazive, au determinat cercetătorii și clinicienii să devină din ce în ce mai creativi în inovarea și dezvoltarea medicamentelor antifungice. Infecțiile produse de fungi oportuniști (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*) afectează pacienții cu deficite imunitare, cum ar fi pacienții HIV-pozitivi, cei transplantați, cei cu diverse forme de cancer care folosesc o chimioterapie agresivă, sau pe cei cărora li se administrează intempestiv antibiotice (1). Toate aceste condiții contribuie la creșterea incidenței micozelor. Deficiențe ale imunității mediate celular predispun gazdele la infecții fungice, cum ar fi candidozele muco-cutanate, criptococoza sau histoplasmoza.

Factorul limitativ al succesului terapeutic în cazul infecțiilor fungice invazive presupune faptul că este necesară anihilarea unui microorganism eucariot (fungul) aflat într-un macroorganism eucariot (omul). Chiar dacă efectul unui antifungic este evident *in vitro* față de o anumită categorie de fungi, acest fapt nu reprezintă o condiție suficientă ca același efect să se manifeste și *in vivo*. Farmacocinetica moleculei cu rol antifungic este un factor important pentru succesul terapiei. Eficacitatea multor substanțe active este limitată de capacitatea lor de a ajunge la situsul țintă. În cele mai multe cazuri, doar o mică cantitate din doza administrată atinge acest situs, în timp ce restul dozei se distribuie în întreg organismul, în funcție de caracteristicile fizico-chimice și proprietățile biochimice ale moleculei respective.

Majoritatea moleculelor antifungice sunt insolubile în mediu apos, ceea ce reprezintă o problemă majoră în transportul și absorbția substanțelor active. În plus, acestea prezintă o toxicitate ridicată față de

\* Năstasă Valentin, Departamentul de Farmacologie - USAMV «Ion Ionescu de la Brad», Aleea Mihail Sadoveanu nr. 8, 700489 – Iași, Romania, e-mail: alvali2003@yahoo.com

## Fungi & Mycotoxins

Volume 1, N° 1, april 2007

structurile proprii ale organismului (atât la nivel hepatic cât și renal). De aceea este necesară folosirea unor molecule *carrier* care pot înlătura aceste neajunsuri, conducând în consecință la creșterea biodisponibilității antifungicelor în focar și diminuarea efectelor adverse. Posibilitatea folosirii sistemelor de eliberare submicronice a fost intuită de Paul Ehrlich, care a emis ideea utilizării unui “glonte magic” încărcat cu diverse substanțe active.

Actualmente, cercetarea în industria farmaceutică este dominată de două tendințe:

- obținerea unor noi molecule cu rol antifungic;
- îmbunătățirea biodisponibilității moleculelor antifungice deja existente, reducerea toxicității acestora prin cuplarea cu sisteme *carrier* coloidale, optimizarea acțiunii *in vivo* a moleculelor antifungice și atenuarea agresivității acestor compuși de tip xenobiotic asupra structurilor celulare și țesuturilor umane.

Prin aceste sisteme *carrier* se urmărește obținerea unui efect de ecranare a proprietăților fizico-chimice indezirabile ale moleculelor cu rol antifungic. Cele mai utilizate sisteme *carrier* sunt reprezentate de lipozomi, ciclodextrine și nanoparticule.

Antifungicele polienice (amfotericina B în special, dar și nistatinul) sunt cele mai eficiente și mai sigure molecule. Spectrul lor de acțiune acoperă toate categoriile de fungi, iar rata de rezistență a tulpinilor este extrem de redusă comparativ cu cea manifestată față de antifungicele de tip azolic. Toxicitatea lor renală (nefrotoxicitatea), explicabilă prin inducerea apoptozei nefrocitelor, le limitează utilizările clinice. Introducerea în uz a formulărilor lipidice a minimalizat efectele toxice ale acestor medicamente și astfel, astăzi ele se utilizează pe scară largă în tratamentul infecțiilor fungice invazive (2).

În anii '80, azolii antifungici, ca itraconazolul și fluconazolul, au cunoscut o largă utilizare, însă creșterea continuă a procentului tulpinilor rezistente în ultimul deceniu, a adus în prim plan problema înlocuirii acestor molecule cu noii triazoli cu spectru larg și o farmacocinetică superioară ca voriconazolul, posaconazolul sau ravuconazolul. Ca urmare a creșterii incidenței SIDA, a transplantelor de organe, a intervențiilor chirurgicale majore, a utilizării antibioticelor cu spectru larg și a corticosteroizilor, se constată o augmentare a incidenței infecțiilor fungice sistemice

produse de diferitele specii aparținând genului *Candida*, a aspergilozelor și zigomicozelor.

Amfotericina B (AMB) este cel mai eficient dar și cel mai toxic antifungic sistemic, având o structură de macrolidă polienică, cu acțiunea cea mai rapidă. Pentru că are proprietăți amfoterice, această substanță activă a fost numită amfotericină. Produsul brut conține 2 componente cu structuri relativ asemănătoare: amfotericina A și AMB. Amfotericina A este o tetraenă, fiind mai puțin activă, iar AMB este o heptaenă, fiind compusul cel mai activ din punct de vedere biologic. Macrociclul are 37 atomi de carbon, 7 duble legături și este legat glicozidic de micozamină. Este utilizată în terapie, ca antifungic, de peste 30 de ani, și în ciuda obținerii a noi molecule antifungice, rămâne totuși antifungicul de primă alegere în infecțiile sistemice fungice severe, fiind și un tratament alternativ în alte micoze. Principala problemă a AMB, ca de altfel a majorității antifungicelor, este insolubilitatea ei în apă. Pentru a deveni activă, trebuie solubilizată în apă, iar modul în care se realizează acest lucru precum și calea de administrare determină efectul ei terapeutic.

Forma farmaceutică uzuală, comercializată sub denumirea de Fungizone, este un amestec de AMB și o substanță cu acțiune de surfactant - deoxicolatul de sodiu, dizolvate în tampon fosfat (3). În aceste condiții, AMB formează o dispersie coloidală, care poate fi administrată intravenos. A fost primul preparat micelar formulat și comercializat începând din 1958. Totuși, în deceniile următoare s-au întreprins cercetări pentru a găsi forme de administrare a amfotericinei B și a altor poliene, în doze mari și cu reacții toxice cât mai reduse. Acest deziderat a fost atins odată cu dezvoltarea formulărilor lipidice ale AMB și nistatinului.

Încorporând molecula cu caracter amfoter în vezicule lipidice s-a putut șunta rinichiul și în consecință, reacțiile nefrotoxice s-au diminuat foarte mult. Formulările lipidice de AMB eliberează substanța activă către țesuturi țintă și în situsurile unde e prezentă infecția, acolo unde sunt acumulări de celule fagocitare. Putem exemplifica prin ALBECET – complex lipidic ce conține 35% AMB, AMPHOTEC - dispersie coloidală cu 50% AMB și AmBISOME - AMB lipozomală cu 10% substanță activă. Toate preparatele pot induce reacții adverse ocazionale, asociate cu dispnee, nefrotoxicitate și hepatotoxicitate, însă de intensitate variată, comparativ cu forma clasică de AMB. Din punct de vedere al eficacității, formulările lipidice s-au dovedit superioare AMB clasice, însă sunt mai costisitoare. Astăzi, AMPHOCIL este cel mai puțin

utilizat datorită faptului că aceste reacții adverse sunt uneori aproximativ la fel de severe ca și în cazul preparatelor clasice. ALBECET induce aceste reacții adverse, însă mai puțin intense, dar totuși semnificative, în timp ce AmbISOME produce reacții adverse minime.

Formulările lipidice se prepară fie cu fosfolipide, fie cu diferite substanțe tensioactive, obținându-se două categorii de preparate: lipozomi și miclele mixte (3). Lipozomii sunt formați din una sau mai multe fosfolipide concentrice, bistratificate, separate de o fază apoasă. Proprietățile lipozomilor diferă de compoziția lipidelor constituente. Miclele sunt particule coloidale obținute prin agregarea moleculelor tensioactive. În lipozomi, AMB este inserată într-o structură lipidică bistratificată, nefiind solubilizată în faza apoasă a acestora. Au mai fost studiate și formulări cu surfactanți neionici, esterii ai sucrozei și polioxi-etilenglicol. Ulterior, au fost preparați lipozomi prin sonicarea unui amestec de AMB, lecitină și alte fosfolipide și steroli.

Preparatele lipozomale diferă în mărime, structură, farmacocinetică și activitate antifungică. Lipozomii eliberează conținutul lor ca răspuns la stimuli de pH sau pot răspunde la un mediu acid, mediu care apare și în țesuturile tumorale. Lipozomii pH-sensibili sunt obținuți din 1,2-dioleilfosfatidil etanolamină și colesteril hemisuccinat. Stabilitatea acestor lipozomi e dependentă de pH, iar *in vivo* ei vor fi destabilizați, rezultând astfel eliberarea antifungicului din interiorul lor. Astfel de lipozomi sunt cei pe bază de nistatin, obținuți dintr-un amestec de nistatin și lipide în raport de 1:20.

Nanoparticulele polimerice, ce posedă o mai bună reproductibilitate și stabilitate decât lipozomii, au fost propuse recent ca alternativă la aceste sisteme *carrier*, ele rezolvând întrucâtva neajunsurile lipozomilor. Nanoparticulele sunt particule coloidale solide, cu diametru cuprins între 1-1000 nm (4). Sunt alcătuite din substanțe macromoleculare și pot fi utilizate în terapie ca adjuvanți ai vaccinurilor sau ca sisteme *carrier* în care substanța activă este dizolvată, închisă, încapsulată, adsorbită sau legată chimic. Polimerii utilizați pentru edificarea nanoparticulelor pot fi sintetici sau naturali. Există două tipuri de nanoparticule, în funcție procesul de preparare: nanosfere și nanocapsule. Nanosferele au o structură de tip monolit, în care medicamentul este dispersat, adsorbit pe suprafața ei. Nanocapsulele au o structură de tip membrană, unde medicamentul este închis în interior sau adsorbit la exterior.

Termenul de nanoparticule se folosește generic pentru ambele tipuri de nanostructuri, fiind

greu de stabilit dacă particulele sunt tip matrice sau tip membrană. Nanoparticulele sunt sisteme *carrier*, dar oferă și o cale de administrare neinvazivă, cum ar fi calea orală, nazală, oculară.

În ciuda acestor avantaje, nu există nanoparticule ideale. Multe dintre ele sunt preparate din polimeri insolubili în apă și presupun utilizarea temperaturilor ridicate sau a solvenților organici ce pot degrada substanța activă. Unele metode de preparare, cum ar fi evaporarea solvenților sau polimerizarea emulsiilor, sunt procese complexe și necesită o serie de etape consumatoare de timp și energie. În contrast, polimerii solubili în apă permit metode mai facile de preparare, care nu implică utilizarea solvenților organici sau a unei viteze mari de forfecare. Dintre acești polimeri hidrosolubili, chitosanul este cel mai studiat. El posedă câteva proprietăți ideale pentru nanoparticulele polimerice *carrier*: biocompatibilitate, biodegradabilitate, lipsă de toxicitate și cost scăzut. Chitosanul este un polimer natural glucidic modificat, preparat prin dezacetilarea parțială a chitinei - un biopolimer natural derivat din carapacea crustaceelor: crabi, homari, etc. A fost descoperit și în compoziția unor microorganisme, ca levuri sau fungi filamentoși. În scop farmaceutic sunt utilizate mai multe forme cu greutate moleculară diferite și cu diferite grade de dezacetilare, acești factori fiind importanți în formarea particulelor și agregare (4). Pentru prepararea nanoparticulelor de chitosan se utilizează mai multe metode, cele mai uzuale fiind gelatinizarea ionotropică și complexarea polielectrolitică. Ele oferă o modalitate simplă de preparare, fără a fi necesari solvenți organici, astfel putând fi incluse și substanțe active mai labile chimic. Substanțele active se asociază cu chitosanul prin interacțiune electrostatică, legături de hidrogen și interacțiuni hidrofobe. Gelatinizarea ionotropică a fost propusă în anul 1997 și se bazează pe interacțiunea electrostatică dintre grupele NH<sub>2</sub> ale chitosanului și sarcinile negative ale polianionilor (e.g. tripolifosfat), într-un mediu apos. Cea de-a doua metodă presupune formarea nanostructurilor prin adăugarea unui polimer cationic la un plasmid ADN, mecanismul de legare presupunând neutralizarea sarcinilor dintre polimer cationic și ADN. Tehnica oferă o preparare ușoară, iar nanoparticulele se formează spontan după adăugarea soluției de ADN, particulele formate având dimensiuni între 50-700 nm.

Nanoparticulele se pot administra intravenos, iar biodisponibilitatea lor variază cu mărimea, sarcina electrică și hidrofobicitatea lor. Particulele cu diametru mai mare de 100 nm sunt rapid absorbite, iar cele mai mici au un timp de

circulație prelungit. Nanoparticulele de chitosan au beneficiat de o atenție sporită, datorită stabilității lor remarcabile, toxicității reduse, metodelor de preparare simple și datorită faptului că oferă variate căi de administrare. Dimensiunile lor submicronice sunt propice administrării parenterale dar și administrării topice, neinvazive, pe mucoasele orală, nazală, oculară. Translocarea substanțelor active la nivelul mucoaselor, facilitată de absorbția chitosanului, este crescută.

Îmbunătățirea solubilității substanțelor bioactive, mărirea stabilității acestora, eliberarea treptată și diminuarea efectelor adverse pot fi de asemenea obținute prin incluziunea în ciclodextrine, care conferă aceste proprietăți noilor medicamente (5,6). Ciclodextrinele, produse prin conversia enzimatică a amidonului, au fost descoperite în 1891, structura fiind elucidată însă mai târziu, la mijlocul anilor '30 (6). Producerea lor la scară industrială a început în anii '70, fiind concentrată cu precădere pe trei ciclodextrine ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (figura nr. 1). În prezent, producția industrială de ciclodextrine, derivați și complecși de incluziune depășește 1000 de tone anual (6).

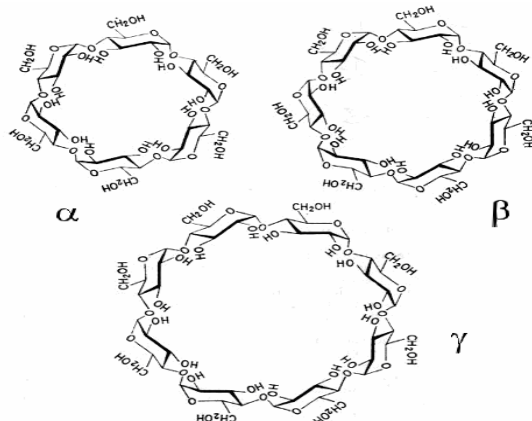


Figura nr. 1. Structura  $\alpha$ -,  $\beta$ - și  $\gamma$ -ciclodextrinelor (6).

Ciclodextrinele sunt molecule formate prin legarea a șase, șapte și respectiv opt resturi glicozidice. Sintetiza lor se realizează concomitent cu alte oligozaharide liniare prin degradarea enzimatică a amidonului de către ciclodextrin glucozil transferaze, generate de *Bacillus macerans* (6). Ele posedă o cavitate hidrofobă de formă tronconică, în interiorul căreia pot fi incluși o serie de compuși organici. Grupările hidroxilice secundare sunt dispuse pe circumferința bazei mari,

iar grupările hidroxilice primare pe cea a bazei mici a trunchiului de con. Dimensiunile celor trei forme prezentate mai sus, respectiv diametrele cavității interioare, sunt: 5,7; 7,8 și 9,5 Å pentru  $\alpha$ -,  $\beta$ - și respectiv  $\gamma$ -ciclodextrină. Odată cu creșterea diametrului cavității ciclodextrinei, aceasta poate găzdui un număr mai mare de molecule de apă, de aceea, în soluție apoasă, molecule de apă legate vor diferi energetic din ce în ce mai puțin față de cele din masa de solvent (6).

Avantajele utilizării acestor ciclodextrine în industria farmaceutică derivă din însăși proprietățile lor fizico-chimice, proprietăți care au abilitatea de a modifica farmacocinetica substanței bioactive complexate. De exemplu, în cadrul unui studiu preliminar comparativ al metabolizării ciclodextrinelor la șobolani, s-a administrat  $\alpha$ -ciclodextrină marcată cu  $C^{14}$ ,  $\beta$ -ciclodextrină sau amidon de cartof gelatinat, aproximativ 2,5 ml de soluție apoasă 2,5 %, demonstrându-se că acele animale care au primit  $\beta$ -ciclodextrină, au metabolizat compusul mai greu decât cele care au primit amidon pe parcursul experimentului. De remarcat este faptul că la finalul colectării datelor, cantitatea totală a dozei excretate (48,6 % și 66,8 % din doza de  $CO_2$ , după 17 și respectiv 23 de ore) era similară cu cea a grupului căruia i s-a administrat amidon. Excreția substanțelor active din urină (3,6 – 5,1 %), fecale (0 – 5,4 %) și nivelurile reziduale din organe și carcase, sunt de asemenea similare atât la grupurile cărora li s-a administrat  $\beta$ -ciclodextrină, cât și la grupurile cărora li s-a administrat amidon (7).

Aceste aspecte conduc la concluzia că  $\beta$ -ciclodextrina este rezistentă la hidroliza acidă și acțiunea  $\alpha$  și  $\beta$  amilazelor, ea nefiind digerată sau absorbită semnificativ în segmentul superior al tubului digestiv (stomac și intestin subțire). Hidroliza cu scindarea lanțului dextrină/glucoză are loc în intestinul gros, sub acțiunea microflorei intestinale și amilazei endogene. În cazul dozelor mari, acest proces poate fi saturat și materialul neabsorbit poate fi excretat prin fecale (8, 9, 10).

În terapia antimicrobică, ciclodextrinele își dovedesc utilitatea în primul rând prin toxicitatea lor redusă, dar și prin capacitatea de a diminua efectul toxic al substanțelor bioactive încapsulate (tabelul 1).

Tabel 1

Formulări farmaceutice de substanțe antimicrobiene (antimicotice și antibiotice)  
complexate cu  $\beta$ - și  $\alpha$ -ciclodextrine

Substanță/ciclodextrină	Denumire comercială	Indicații	Formă farmaceutică	Companie/Țară
Voriconazol/ $\beta$ -CD sulfobutil	Vfend	Antimicotic	Sol. inj. IV	Pfizer, SUA
Intraconazol / $\beta$ -CD HP	Sporanox	Antimicotic	Soluție PO	Janssen, Belgia
Cefalosporin / $\beta$ -CD	Meiact	Antibiotic	Tablete	Meiji Seika, Japonia
Cefotiam-hexetil / $\alpha$ -CD	Pansporin T	Antibiotic	Tablete	Takeda, Japonia

De exemplu, într-un studiu realizat pe parcursul a 24 de săptămâni pe câini din rasa Beagle pentru determinarea toxicității acute orale a  $\beta$ -ciclodextrinei, nu au fost înregistrate manifestări semnificative de toxicitate. Toate animalele supuse experimentului au supraviețuit, cu excepția unui subiect din grupul cărui a s-a administrat doza cea mai mare. Acesta a manifestat hipertermie, și-a pierdut apetitul și a manifestat catar ocular în timpul ultimei săptămâni de studiu. Deși animalul se afla sub tratament antiinfecțios, tratamentul cu  $\beta$ -ciclodextrină a fost continuat și pe parcursul acestei perioade. În timpul studiului au fost înregistrate câteva cazuri de sindrom diareic, dar care s-au remis sub tratament specific, aspect care scoate din culpă  $\beta$ -ciclodextrina; nu s-au detectat modificări semnificative ale pulsului și parametrilor biochimici sanguini. La examenul necropsic, nu existau modificări semnificative în greutatea organelor, deși greutatea relativă și absolută a ficatului tindea să fie mai mică la toate grupurile supuse tratamentului cu  $\beta$ -ciclodextrină. Greutatea relativă și absolută a splinei a fost ușor crescută la toate grupurile tratate. Modificările histopatologice observate au fost atribuite modului de sacrificare (eutanasie cu soluție suprasaturată de sulfat de magneziu) și nu erau legate de dozaj (11, 12). Toate aceste aspecte conduc la observația că  $\beta$ -ciclodextrina (ca produs de incluziune) nu induce un efect toxic semnificativ, situațiile deosebite fiind atribuite condițiilor deficitare de întreținere a unor subiecți infestați cu paraziți.

De altfel, lipsa de toxicitate a ciclodextrinelor este demonstrată și prin unele studii speciale de teratogenitate. De exemplu, unui număr de 30 femele de șobolani gestante li s-a administrat oral, o doză zilnică de 5000 mg/kg  $\beta$ -ciclodextrină în soluție apoasă de metilceluloză 1%. Administrarea complexului s-a efectuat începând cu ziua a 7-a de gestație și s-a încheiat în ziua a 16-a. Femelele au fost apoi sacrificate în ziua 21 de gestație, iar în urma examinării nu au fost puse în

evidență modificări semnificative de fetotoxicitate sau teratogenitate (13).

Studiile efectuate la om, pe voluntari sănătoși și pacienți cu ileostomă, cărora li s-au administrat zilnic doze de 10 g  $\beta$ -ciclodextrină, fracționate în 3 prize, ne demonstrează existența aceluiași comportament farmacocinetic în ceea ce privește absorbția și metabolizarea, acestea fiind greu realizabile la nivelul stomacului și intestinului subțire, dar ușor de realizat la nivelul colonului, sub acțiunea microflorei endogene (14).

Studiile metabolice efectuate la oameni și animale indică cu certitudine că ciclodextrinele sunt metabolizate și absorbite în ultima porțiune a tubului digestiv. Metabolizarea se realizează prin hidroliză, de către microflora rezidentă la acest nivel. O mică proporție din ciclodextrinele administrate este absorbită intactă (nemetabolizată). Toxicitatea acută a ciclodextrinelor este nesemnificativă în cazul administrării orale (la câine, limita de siguranță a fost stabilită la 200). Studiile de genotoxicitate vin să completeze acest aspect, prin lipsa fetotoxicității și teratogenității.

Toate aceste aspecte farmacologice demonstrează potențialul acestor substanțe de a fi ușor complexate cu substanțe antimicrobiene de tipul antimicoticelor, pentru a le mări stabilitatea farmaceutică, pentru a le elibera treptat și a le diminua efectele adverse.

#### Bibliografie

1. Nosanchuk J D – Current status and future of antifungal therapy for systemic mycoses; *Recent Patent on Anti-Infective Drug Discovery* 2006; 1(1):75-84.
2. Varlam D E, Siddiq M M, Parton L A, Russmann H – Apoptosis contributes to amphotericin B – induced nephrotoxicity; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45(3): 679-685.

## Fungi & Mycotoxins

Volume 1, N° 1, april 2007

3. Brajtborg J, Bolard J – Carrier effects on biological activity of amphotericin B; *Clinical Microbiology Reviews* 1996; 9(4):512-531.
4. Tiyaboonchai W – Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery; *Naresuan University Journal* 2003; 11(3):51-66.
5. Suflet M D, Chițanu G C - New support with potential biomedical application based on modified polysaccharides; *Farmaceutski vestnik* 2003; 54:383.
6. Szejtli J - Past, present and future of cyclodextrin research; *Pure Applied Chemistry* 2004; 76(10):1825 – 1845.
7. Gerloczi A, Fnagy A, Keresztes P *et al.* - Absorbtion, distribution, excretion and metabolism of orally administered <sup>14</sup>C - β-cyclodextrin in rat; *Drug Research* 1985; 35:1042 – 1047.
8. Szejtli J, Gerl C A, Fnagy A - Intestinal absorption of <sup>14</sup>C-labelled β-cyclodextrin in rats; *Drug Research* 1980; 30:808 – 810.
9. Andersen G H, Robins F M, Domingues F J *et al.* - The utilization of Schardinger dextrans by the rat; *Toxicology and Applied Pharmacology* 1963; 5:257–266.
10. Gerloczi A, Fnagy A, Szejtli J - Absorbtion and metabolism of β-cyclodextrin by rats; *Proceedings of the 1st International Symposium on Cyclodextrins*; Budapest; Hungary; Akademiai Kiado - Budapest and Reidel Publishing, Dordrecht, The Netherlands, 1981.
11. Haraszti J - Twenty-four week oral toxicity study of β-cyclodextrin in Beagle dogs; *Unpublished report of Institute of Obstetrics*, Department of Surgery, Budapest, Hungary; submitted to WHO by Société Roquette Frères, Lestrem, France, 1978.
12. Tury E, Dobos-Kovucs M, Somogyvuri K - The pathological and histo-pathological study of Beagle dogs subjected to β-cyclodextrin treatment for twenty-four weeks; *Unpublished report of the Departments of Surgery and Pathology*, University of Veterinary Freres, Lestrem, France, 1978.
13. Leroy P - Teratogenicity study of orally administered β-cyclodextrin in rats. *Unpublished report of the Biotoxicology Laboratory*, No. 90021, Roquette Frères; submitted to WHO by Société Roquette Frères, Lestrem, France, 1991.
14. **Flourie B** - Digestibility of β-cyclodextrin in the human intestine; *Unpublished report of INSERM*, U290; submitted to WHO by Société Roquette Frères, Lestrem, France, 1992.