



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Andrea Lončarević Vrabec

CHITOSAN-BASED MICROSPHERES AS DRUG DELIVERY SYSTEMS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Andrea Lončarević Vrabec

MIKROSFERE NA TEMELJU KITOZANA KAO SUSTAVI ZA DOSTAVU LIJEKA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

ANDREA LONČAREVIĆ VRABEC

CHITOSAN-BASED MICROSPHERES AS DRUG DELIVERY SYSTEMS

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Assoc. Prof. Anamarija Rogina, PhD, University of Zagreb Faculty of
Chemical Engineering and Technology, Croatia

Prof. Gloria Gallego Ferrer, PhD, Center for Biomaterial and Tissue
Engineering, Universitat Politècnica de València, Spain

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

ANDREA LONČAREVIĆ VRABEC

MIKROSFERE NA TEMELJU KITOZANA KAO SUSTAVI ZA DOSTAVU LIJEKA

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Izv. prof. dr. sc. Anamarija Rogina, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije, Hrvatska

Prof. dr. sc. Gloria Gallego Ferrer, Centro de Biomateriales e Ingeniería
Tisular, Universitat Politècnica de València, Španjolska

Zagreb, 2025.

Abstract

Osteosarcomas, the most common type of primary bone tumor affecting children, adolescents, and young people, usually occur in long bones and are treated with surgery, which is preceded by biopsy and chemotherapy. Chemotherapy is often continued after surgery. Since antitumor drugs are administered intravenously, very high concentrations are required to inhibit tumor cell growth, exposing the entire body to the effects of the drug. Additionally, conventional chemotherapeutic drugs often have drawbacks, including reduced solubility, nonselective distribution, and adverse effects after oral or intravenous administration, which limit their clinical use. To reduce these negative effects, chitosan (CHT)-based drug delivery systems for local delivery have been proposed.

In this study, microspheres based on chitosan physically crosslinked with copper(II) ions (CHT-Cu complex) were successfully prepared by emulsion and electrohydrodynamic atomization (electrospraying) process. Additionally, composite microspheres with calcium phosphate (CaP) ceramics in varying amounts (0, 5, and 10 wt.% of CaPs) were prepared. The emulsion-prepared CHT-Cu/CaP0 microspheres were spherical (circularity factor ~ 1) with smooth surface and an average size of $30.1 \pm 9.1 \mu\text{m}$. The size of the electrosprayed microspheres ranged from 50 to 110 μm , depending on the CaP content. FTIR spectroscopy and X-ray diffraction analysis indicated interactions between the CHT-Cu matrix and the precipitated CaP filler, likely in the form of hydroxyapatite. A Cu^{2+} release study conducted under conditions simulating *in vitro* biological research indicated a significantly higher metal release from the microspheres in complete cell culture medium compared to phosphate buffer at pH 7.4. Doxorubicin (DOX), used as a model antitumor drug, was incorporated into the CHT-Cu/CaP microspheres utilizing the pH-sensitivity of the CHT matrix. Successful drug loading was confirmed by fluorescence microscopy. DOX release was shown to depend on the pH value and chemical composition of the incubation medium, as well as the chemical composition of the drug-loaded microcarrier, indicating the ability of the DOX-loaded microcarriers to locally release DOX in a pH-triggered manner. It can be assumed that modification of CHT-based microspheres by adding CaPs increased the DOX loading efficiency. Biological evaluation of the as-prepared and drug-loaded microcarriers indicated synergistic effect of the drug and Cu^{2+} ions, and material selectivity towards MG-63 tumor cells. The optimal DOX-loaded material concentration for inhibiting osteosarcoma cell growth without having a harmful effect on normal cells was 0.5 mg mL^{-1} .

Overall, physicochemical and biological characterization of the prepared CHT-Cu/CaP microspheres and DOX-loaded microcarriers indicated the successful preparation of smart drug delivery systems for bone tumor treatment.

Keywords: calcium phosphates, chitosan, copper, doxorubicin, drug delivery systems, microspheres, osteosarcomas, pH-sensitivity, selective materials.

Sažetak

Osteosarkomi, najčešća vrsta primarnog tumora (dugih) kostiju koji se javlja kod djece, adolescenata i mladih ljudi, obično se liječe kirurškim zahvatom, kojem prethode biopsija i kemoterapija. Kemoterapija se često nastavlja i nakon operacije. Budući da se antitumorski lijekovi administriraju intravenozno, potrebne su vrlo visoke koncentracije za inhibiciju rasta tumorskih stanica, a čime se cijelo tijelo izlaže djelovanju lijeka. Nadalje, konvencionalni kemoterapijski lijekovi često imaju štetne učinke, kao što su smanjena topljivost i neselektivna distribucija, što ograničava njihovu kliničku primjenu. Kako bi se smanjili ovi negativni učinci, predloženi su sustavi za lokalnu dostavu lijeka koji se temelje na kitozanu (CHT).

U ovom radu, mikrosfere na temelju kitozana fizikalno umreženoga s bakrovim(II) ionima (CHT-Cu kompleks) uspješno su dobivene postupkom iz emulzije i primjenom elektrohidrodinamičke atomizacije (EHDA proces, elektroštrcanje). Dodatno su pripremljene i kompozitne mikrosfere s kalcij-fosfatnom (CaP) keramikom u različitim masenim udjelima (0, 5 i 10 mas.%). CHT-Cu/CaP0 mikrosfere dobivene iz emulzije bile su sferične (faktor sferičnosti ~ 1) s glatkom površinom i prosječnom veličinom od $30,1 \pm 9,1 \text{ }\mu\text{m}$. Prosječna veličina CHT-Cu/CaP mikrosfera dobivenih EHDA procesom bila je između 50 i 110 μm , ovisno o količini CaP punila. FTIR spektroskopija i XRD analiza ukazale su na prisutnost interakcija između CHT-Cu matrice i istaloženoga CaP punila, vjerojatno u obliku hidroksiapatita. Otpuštanje Cu^{2+} iona iz CHT-Cu/CaP0 mikrosfera istraženo je pri uvjetima koji simuliraju biološka istraživanja, te rezultati ukazuju na znatno veće otpuštanje metalnih iona u mediju za staničnu kulturu u odnosu na fosfatni pufer pH vrijednosti 7,4. Doksorubicin (DOX), korišten kao modelni antitumorski lijek, uklopljen je u CHT-Cu/CaP mikrosfere koristeći svojstvo pH-osjetljivosti CHT matrice. Uspješno uklapanje lijeka u mikronosače potvrđeno je primjenom fluorescentne mikroskopije. Otpuštanje DOX-a iz mikronosača ovisi o pH-vrijednosti i sastavu medija za inkubaciju, te o kemijskom sastavu mikronosača, što ukazuje na to da su DOX-mikronosači pH-osjetljivi. Također, može se pretpostaviti da je modifikacija CHT-Cu mikrosfera dodatkom CaP-a povećala učinkovitost uklapanja DOX-a. Biološka ispitivanja pripremljenih CHT-Cu/CaP mikrosfera i mikronosača s uklopljenim lijekom pokazala su sinergijski učinak lijeka i Cu^{2+} iona te selektivnost materijala prema tumorskim stanicama. Kao optimalna koncentracija materijala s DOX-om za inhibiciju rasta stanica osteosarkoma bez štetnog učinka na zdrave stanice pokazala se $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

Zaključno, fizikalno-kemijska i biološka karakterizacija pripremljenih CHT-Cu/CaP mikrosfera i mikronosača s uklopljenim DOX-om ukazala je na uspješnu pripremu pametnih sustava za isporuku lijekova za liječenje tumora kostiju.

Ključne riječi: bakar, doksorubicin, kalcijevi fosfati, kitozan, mikrosfere, osteosarkomi, pH-osjetljivost, selektivni materijali, sustavi za dostavu lijeka.