



COMPORTAMENTO TERMODINÂMICO DA ADSORÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO OMEPRAZOL NA FASE ESTACIONÁRIA QUIRAL TRIS(3,5-DIMETILFENILCARBAMATO) DE AMILOSE

A. F. N. DOMINGUES¹ e C. C. SANTANA²

¹ Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Agroindústria

² Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

E-mail para contato: ferraiolo@cpatu.embrapa.br

RESUMO –O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento termodinâmico da adsorção dos enantiômeros do omeprazol na fase estacionária quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, sintetizada em larga escala a partir de uma metodologia definida em escala analítica. Para avaliar as constantes de Henry e os parâmetros termodinâmicos foram realizados experimentos de pulsos cromatográficos com soluções do traçador e da mistura racêmica em diferentes temperaturas e vazões da fase móvel. As isotermas de adsorção foram determinadas das curvas de ruptura obtidas com soluções da mistura racêmica em diferentes concentrações. As constantes de Henry diminuíram com a elevação da temperatura devido a uma aproximação dos picos cromatográficos. Valores negativos das variações de entalpia e entropia indicaram que é energeticamente mais favorável o soluto estar na adsorvido na fase estacionária do que em solução e que os enantiômeros encontram-se mais ordenados no estado adsorvido, respectivamente. No intervalo de concentração analisado, o modelo de isoterma de Langmuir foi bem correlacionado aos dados experimentais de equilíbrio. A capacidade de saturação da fase estacionária sintetizada é relativamente inferior à capacidade da mesma fase disponível comercialmente. A diferença está provavelmente relacionada à derivação dos grupos hidroxila da amilose e à obtenção de um derivado de uréia, durante a reação de síntese do carbamato, e ao processo de recobrimento.

1. INTRODUÇÃO

Devido a incontestável influência do estereoisomerismo sobre as propriedades físico-químicas, cinéticas e dinâmicas de fármacos quirais (Noël *et al.*, 2004), autoridades governamentais que regularizam a produção, o registro e a distribuição de medicamentos, como o *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos e órgão similar no Canadá, têm destacado a importância do planejamento e síntese de novos produtos farmacêuticos na forma de enantiômeros puros.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais utilizada na determinação do excesso ou pureza enantiomérica da matéria-prima e de formulações farmacêuticas comercializadas como enantiômeros puros (Bonato *et al.*, 2005).



Neste caso, a retenção do soluto está relacionada à razão dos tempos que as moléculas ficam na fase estacionária, t_R , e na fase móvel, t_M (Collins, 2006).

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad (1)$$

O fator de separação, α , é dado por (Cabusas, 1998):

$$\alpha = \frac{k_R}{k_S} \quad (2)$$

onde k_R e k_S são os fatores de retenção dos enantiômeros mais e menos retido, respectivamente.

Uma vez que o fator de retenção está diretamente relacionado à constante de equilíbrio (K), tem-se pela relação da energia livre de Gibbs (ΔG^0):

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = -RT \ln \left(\frac{k}{\varphi} \right) \quad (3)$$

onde R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta e φ é a razão de fases ($\varepsilon_T/(1-\varepsilon_T)$, ε_T = porosidade total).

Os valores de ΔH^0 (variação de entalpia) e ΔS^0 (variação de entropia), de ambos enantiômeros, são determinados utilizando-se a equação de van't Hoff (Weng *et al.*, 2005).

$$\ln k = \frac{-\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \varphi \quad (4)$$

Considerando $\Delta(\Delta G^0)$ a diferença entre a variação da energia livre de Gibbs da interação dos dois enantiômeros com a fase estacionária quiral, tem-se que:

$$\alpha_{RS} = \exp \left[\frac{-\Delta(\Delta G^0)}{RT} \right] \quad (5)$$

Aplicando Gibbs-Helmholtz ($\Delta G^0 = \Delta H - T\Delta S^0$) na Equação 5 (Cabusas, 1998):

$$R \ln \alpha_{RS} = \frac{-\Delta(\Delta H^0)}{T} + \Delta(\Delta S^0) \quad (6)$$

sendo $\Delta(\Delta H^0)$ e $\Delta(\Delta S^0)$ as diferenças de entalpia e entropia das interações dos enantiômeros R e S com a fase estacionária, respectivamente.

A temperatura na qual não há resolução enantiomérica ($\Delta_{RS}(\Delta G^0)=0$) é denominada temperatura isoenantioseletiva (T_{iso}).



$$T_{iso} = \frac{\Delta_{RS}(\Delta H^0)}{\Delta_{RS}(\Delta S^0)} \quad (7)$$

As condições ótimas de operação e desenvolvimento de uma separação em CLAE podem ser determinadas a partir de cálculos computacionais. No entanto, estes cálculos requerem um conhecimento prévio sobre a cinética e a termodinâmica dos processos cromatográficos. A cinética é caracterizada pela transferência de massa na coluna e a termodinâmica pelas isotermas dos componentes da alimentação (Gritti e Guiochon, 2003).

O modelo de isoterma de Langmuir (Equação 8) é o mais comumente utilizado para analisar isotermas de equilíbrio não-lineares (Fornstedt *et al.*, 1999).

$$q_i = \frac{a_i c_i}{1 + b_i c_i} = \frac{b_i q_s c_i}{1 + b_i c_i} \quad (8)$$

onde, b_i é a constante de equilíbrio de adsorção, relacionada a energia de adsorção, q_s ($= a_i/b_i$) é a capacidade de saturação do adsorvente e a_i ($= q_s b_i$) é o coeficiente de distribuição, também chamado de constante de Henry em baixas concentrações de soluto ($a_i = H_{0,i} = dq_i/dc_i|_{c \rightarrow 0}$).

A análise frontal é o método dinâmico mais utilizado para determinar as isotermas de adsorção devido a sua precisão e simplicidade (Felinger *et al.*, 2003). O método refere-se à determinação de isotermas a partir das curvas de ruptura (Seidel-Morgenstern, 2004). Pode ser realizado pelo método do pulso ou pelo método de degraus consecutivos (Sun *et al.*, 2001).

No primeiro método, a curva de ruptura para uma mistura binária exibe um platô intermediário na etapa de adsorção e dessorção, cuja largura diminui com o aumento da concentração dos dois componentes na fase móvel (Sun *et al.*, 2001). Os dados experimentais para a determinação das isotermas podem ser obtidos da etapa de adsorção ou dessorção da curva de ruptura, segundo as Equações 9 e 10. A concentração de cada componente adsorvido na superfície do adsorvente é determinada do volume de retenção das duas frentes da curva e da composição de cada componente nos platôs intermediários (Cherrak *et al.*, 2000).

$$q_i = \frac{(V_2 - V_0)(c_{i,b} - c_{i,a}) - (V_2 - V_{1,ads})(c_{i,pi} - c_{i,a})}{V_a} \quad (9)$$

$$q_i = \frac{(V_2 - V_0)(c_{i,b} - c_{i,a}) - (V_2 - V_{1,des})(c_{i,pi} - c_{i,a})}{V_a} \quad (10)$$

onde V_2 é o volume de retenção da segunda frente da curva de ruptura nas etapas de adsorção e dessorção; V_0 , o volume morto da coluna; $V_{1,ads}$, o volume de retenção da primeira frente da curva de ruptura na etapa de adsorção; V_a , é o volume de adsorvente; $V_{1,des}$, o volume de retenção da primeira frente da curva de ruptura na etapa de dessorção; $c_{i,b}$, a concentração do



componente i na segunda frente da curva de ruptura, $c_{i,a}$, a concentração do componente i na alimentação em $t(0$ e $c_{i,pi}$, a concentração do componente i no platô intermediário.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento termodinâmico da adsorção dos enantiômeros do omeprazol na fase estacionária quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, sintetizada em larga escala a partir de uma metodologia definida em escala analítica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

A mistura racêmica da fármaco omeprazol (OMP) foi doada pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda (Itapira, São Paulo).

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters, modelo 2487), composto por duas bombas (modelo 1525) e detector de absorvância no ultravioleta-visível (UV-vis). Os perfis de eluição foram registrados pelo software Breeze. Os materiais e solventes utilizados nas análises foram: metanol (J.T. Baker, EUA), 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB) (Aldrich, EUA) e nove colunas cromatográficas semipreparativas (SP) (25 x 1,0 cm D.I.) contendo a fase estacionária quiral (FEQ) tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

2.2. Procedimento Experimental

A colunas cromatográficas, contendo a FEQ tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, adsorvida fisicamente em partículas de sílica Luna NH₂, foram confeccionadas por Freitas (2009), de acordo com a metodologia descrita em Matlin *et al.* (1994).

Constantes de Henry (H): As constantes de Henry foram determinadas utilizando-se a Equação 11 (Kostova e Bart, 2007).

$$H = \left(\frac{t_R - t_M}{t_M} \right) \frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T} = \frac{k}{\phi} \quad (11)$$

A porosidade total ((tempo de retenção do componente não retido x vazão da fase móvel)/volume da coluna) foi determinada por experimentos de pulsos cromatográficos com o 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB). Foram realizadas injeções de 20 µL (3,0 mg/mL) e as respostas dos pulsos monitoradas no comprimento de onda de 254 nm.

Influência da temperatura: A resolução (R_S) e os fatores de separação (α) e retenção (k) foram avaliados em função da temperatura e vazão da FM e calculados pelo software do equipamento.

Os parâmetros termodinâmicos ΔH^0 e ΔS^0 foram determinados através da Equação 4. $\Delta(\Delta H^0)$ e $\Delta(\Delta S^0)$ foram obtidos da Equação 6.



Influência da concentração de soluto: As isotermas de adsorção foram determinadas das curvas de ruptura obtidas com soluções da mistura racêmica de concentrações (C) iguais a 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mg/mL na coluna SP6.

As condições cromatográficas, comprimento de onda (λ), temperatura (T) e vazão (Q) de fase móvel, utilizadas no experimento foram 350 nm, 25 °C e 2,0 mL/min, respectivamente. Como fase móvel utilizou-se metanol (100%). Devido à extrapolação do limite de detecção do sistema cromatográfico, o comprimento de onda foi alterado de 302 nm para 350 nm.

Os dados experimentais de equilíbrio foram obtidos da frente de adsorção de cada curva de ruptura e correlacionados ao modelo de Langmuir. A concentração do enantiômero menos retido no platô intermediário foi determinada da curva de calibração do detector UV-vis e os volumes de retenção dos pontos de inflexão da curva de ruptura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 mostra as constantes de Henry determinadas a partir da porosidade total e dos tempos de retenção dos enantiômeros e do TTBB.

Tabela 1 - Constantes de Henry

Coluna	H (S-(-)-OMP)	H (R-(+)-OMP)	Coluna	H (S-(-)-OMP)	H (R-(+)-OMP)
SP1	7,8 ± 0,3	10,27 ± 0,07	SP6	6,8 ± 0,1	8,9 ± 0,09
SP2	4,21 ± 0,04	5,93 ± 0,04	SP7	4,8 ± 0,1	6,1 ± 0,1
SP3	6,3 ± 0,5	8,7 ± 0,6	SP8	8,1 ± 0,3	10,1 ± 0,4
SP4	7,3 ± 0,1	9,2 ± 0,2	SP9	7,1 ± 0,2	9,3 ± 0,2
SP5	6,9 ± 0,2	8,9 ± 0,2			

Condições experimentais: C = 0,1 mg/mL; T = 25 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; Q = 3,0 mL/min; $\lambda = 302 \text{ nm}$.

Os valores mais elevados para o enantiômero mais retido, R-(+)-omeprazol, indicam uma maior afinidade da fase estacionária por esse enantiômero do que pelo enantiômero S-(-)-omeprazol. As variações das constantes de Henry, cujos valores variaram aproximadamente 100% entre algumas colunas, se deve à pequenas variações nas porosidades devido ao método de empacotamento (Freitas, 2009).

As Figuras 3 e 4 mostram a influência da temperatura sobre os fatores de retenção e separação dos enantiômeros do omeprazol na coluna SP1, reportados pelo gráfico de van't Hoff. Os gráficos apresentaram um comportamento linear o que demonstra que a FEQ não sofre mudanças de conformação no intervalo de temperatura considerado. Neste caso, o mecanismo de reconhecimento quiral não é afetado pelo aumento da temperatura e os parâmetros termodinâmicos ΔH^0 e $\Delta(\Delta H^0)$ são independentes da mesma (Gossens *et al.*, 2004; Rojkovicová *et al.*, 2004). Além disso, os fatores de retenção e separação dos enantiômeros decresceram com o aumento da temperatura. Tal comportamento pode ser atribuído ao fato de que os enantiômeros, em nível molecular, têm uma menor interação com a FEQ com a

elevação da temperatura e por isso migram mais rápido através da coluna (Zabka e Rodrigues, 2007). Resultados similares foram obtidos com as colunas SP5 e SP7 (Freitas, 2009).

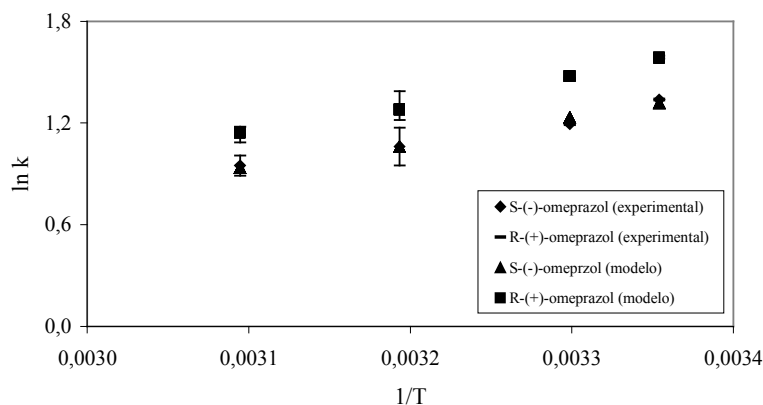


Figura 3 - Gráfico semi-logarítmico do fator de retenção em função da temperatura.

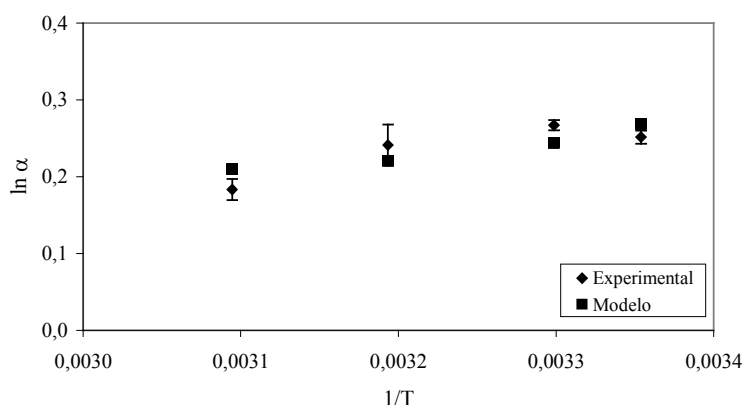


Figura 4 - Gráfico semi-logarítmico do fator de separação em função da temperatura.

Os valores de ΔH^0 , ΔS^0 , $\Delta(\Delta H^0)$ e $\Delta(\Delta S^0)$ são apresentados na Tabela 2. Os valores negativos de ΔH^0 indicam que é energeticamente mais favorável o soluto estar na adsorvido na FEQ do que em solução. Além disso, o valor deste parâmetro foi maior para o enantiômero R-(+) devido a sua maior interação com a FEQ. O mesmo comportamento para o enantiômero mais retido foi observado por outros autores (Péter *et al.*, 2002).

Tabela 2 - Parâmetros termodinâmicos

Enantiômero	S-(-)-OMP	R-(+)-OMP
ΔS (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)	-36 ± 4	-40 ± 3
ΔH (kJ.mol ⁻¹)	-16 ± 1	-17,8 ± 0,9
R ²	0,83	0,92
$\Delta\Delta S$ (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)		-4 ± 1
$\Delta\Delta H$ (kJ.mol ⁻¹)		-1,9 ± 0,4
R ²		0,57



Os valores negativos de ΔS^0 indicam que os enantiômeros do omeprazol encontram-se mais ordenados no estado adsorvido do que em solução.

A temperatura isoenantioseletiva foi 187 °C. Nesta temperatura não ocorre separação enantiomérica, os termos entálpicos e entrópicos são balanceados ($\alpha = 1$ e $\Delta(\Delta G^0) = 0$) e há inversão na ordem de eluição dos enantiômeros. No entanto, como todos os experimentos foram realizados em temperaturas inferiores a temperatura isoenantioseletiva, não houve inversão na ordem de eluição e o processo de separação é controlado por efeitos entálpicos, o que corrobora os valores de $\Delta(\Delta H^0)$ encontrados.

A Figura 5 mostra a curva da derivada do perfil de eluição e a curva de ruptura da frente de adsorção obtida para a mistura racêmica com concentração igual a 2,0 mg/mL.

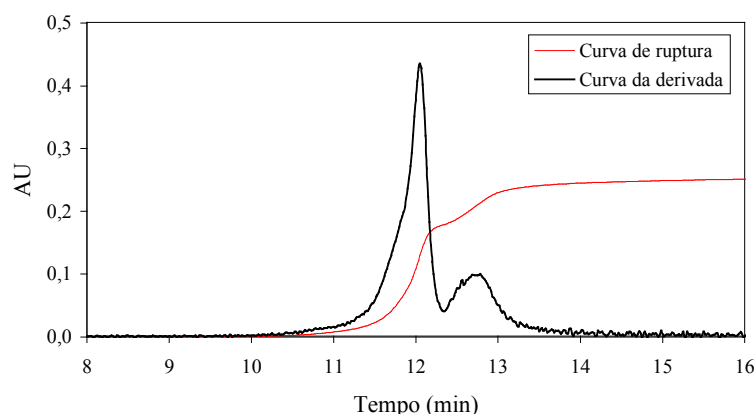


Figura 5 - Curva da derivada do perfil de eluição e curva de ruptura da frente de adsorção. Coluna SP6 (25 x 1,0 cm D.I.). Condições experimentais: C = 2,0 mg/mL; T = 25 °C; FM = metanol (100%); Q = 2,0 mL/min; $\lambda = 350$ nm.

O primeiro e o segundo ponto de máximo da curva da derivada correspondem, respectivamente, aos volumes de retenção da primeira e segunda frente da curva de ruptura. O ponto de mínimo da curva da derivada corresponde à concentração do enantiômero menos retido no platô intermediário.

Concentrações superiores a 4,0 mg/mL não foram injetadas na coluna cromatográfica devido à falta de detecção do platô intermediário decorrente do efeito de sobrecarga. Comportamento semelhante foi observado por Kostova e Bart (2008).

As isotermas de adsorção dos enantiômeros do omeprazol a 25 °C, apresentadas na Figura 6, foram analisadas e validadas de acordo com a metodologia proposta por Gritti e Guiochon (2005). O mesmo procedimento foi utilizado por Cherrak *et al.* (2000) e Samuelsson *et al.* (2008).

Os parâmetros do modelo de Langmuir, constantes de equilíbrio (a e b) e capacidade de saturação da fase estacionária (q_s), estão apresentados na Tabela 3.



Tabela 3 - Parâmetros do modelo de Langmuir

	S-(-)-OMP	R-(+)-OMP
a	$2,33 \pm 0,08$	$2,9 \pm 0,2$
b (mL/mg)	$0,368 \pm 0,007$	$0,45 \pm 0,02$
q_s (mg/mL)	$6,33 \pm 0,08$	$6,4 \pm 0,2$
R^2	1,00	1,00

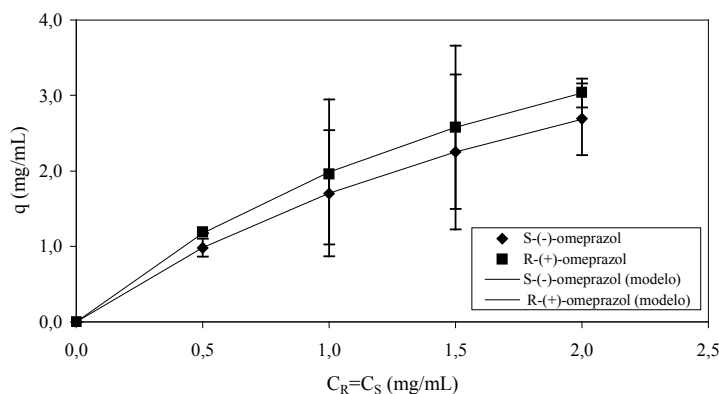


Figura 6 - Isotermas de adsorção.

A capacidade de saturação da FEQ sintetizada e utilizada neste trabalho é relativamente inferior à capacidade de saturação da mesma FEQ comercial Chiralpak AD encontrada na literatura (23,60-177,90 g/L) (Mihlbachler *et al.*, 2002, 2006; Ribeiro *et al.*, 2008; Zabka e Rodrigues, 2008). A diferença entre os valores de q_s , obtidos nesse estudo e os encontrados na literatura, está provavelmente relacionada à derivação dos grupos hidroxila da amilose e à obtenção de um derivado de uréia, durante a reação de síntese do carbamato, e ao processo de recobrimento (partículas agregadas).

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados observou-se que os valores da constante de Henry diminuíram com a elevação da temperatura devido a uma aproximação dos picos cromatográficos. O aumento da temperatura diminuiu a viscosidade da fase móvel e consequentemente os tempos de retenção dos enantiômeros e a sua interação com a FEQ. Valores mais elevados para o R-(+)-omeprazol indicam uma maior afinidade da fase estacionária por esse enantiômero do que pelo enantiômero S-(-).

Os valores negativos de ΔH^0 indicam que é energeticamente mais favorável o soluto estar na adsorvido na FEQ do que em solução. Além disso, o valor deste parâmetro foi maior para o enantiômero R-(+) devido a sua maior interação com a FEQ. Os valores negativos de ΔS^0 indicam que os enantiômeros do omeprazol encontram-se mais ordenados no estado adsorvido do que em solução.

No intervalo de concentração analisado, o modelo de isoterma de Langmuir foi bem correlacionado aos dados experimentais de equilíbrio. A capacidade de saturação da fase estacionária sintetizada neste trabalho é relativamente inferior à capacidade da mesma fase



disponível comercialmente. A diferença está provavelmente relacionada à derivação dos grupos hidroxila da amilose e à obtenção de um derivado de uréia, durante a reação de síntese do carbamato, e ao processo de recobrimento.

5. REFERÊNCIAS

ARNELL, R.; FORSSÉN, P.; FORNSTEDT, T. Accurate and rapid estimation of adsorption isotherms in liquid chromatography using the inverse method on plateaus *J. Chromatogr., A*, 1099, p. 167-174, 2005.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. *Quím. Nova*, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

CABUSAS, M. H. Y. *Chiral separations on HPLC derivatized polysaccharide CSPs: temperature, mobile phase and chiral recognition mechanism studies*. 1998. Thesis (PhD)-Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1998.

CHERRAK, D. E.; KHATTABI, S.; GUIOCHON, G. Adsorption behavior and prediction of the band profiles of the enantiomers of 3-chloro-1-phenyl-1-propanol. Influence of the mass transfer kinetics. *J. Chromatogr., A*, 877, p. 109-122, 2000.

COLLINS, C. H. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. cap. I, p. 17-45.

FELINGER, A.; ZHOU, D.; GUIOCHON, G. Determination of the single component and competitive adsorption isotherms of the 1-indanol enantiomers by the inverse method. *J. Chromatogr., A*, 1005, p. 35-49, 2003.

FORNSTEDT, T.; GÖTMAR, G.; ANDERSSON, M.; GUIOCHON, G. Dependence on the mobile-phase pH of the adsorption behavior of propranolol enantiomers on a cellulose protein used as the chiral selector. *J. Am. Chem. Soc.*, 121, p. 1164-1174, 1999.

FREITAS, A. F. *Caracterização e aplicação da fase estacionária quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose na separação preparativa dos enantiômeros do omeprazol*. 2009. 118 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

GOOSSENS, J. F.; FOULON, C.; BAILLY, C.; BIGG, D. C. H.; BONTE, J. P.; VACCHER, C. Chiral resolution of enantiomers of homocamptothecin derivatives, antitumor topoisomerase I inhibitors, using high performance liquid chromatography on polysaccharide-based chiral stationary phases. *Chromatographia*, v. 59, n. 5/6, p. 305-313, 2004.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. New thermodynamically consistent competitive adsorption isotherm in RPLC. *J. Colloid Interface Sci.*, 264, p. 43-59, 2003.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Critical contribution of nonlinear chromatography to the understanding of retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1099, p. 1-42, 2005.

KOSTOVA, A.; BART, H. J. Preparative chromatographic separation of amino acid racemic mixtures. I Adsorption isotherms. *Sep. Sci. Technol.*, 54, p. 340-348, 2007.



MATLIN, S. A.; TIRITAN, M. E.; CRAWFORD, A. J.; CASS, Q. B.; BOYD, D. R. High with carbohydrate carbamate chiral phases: Influence of chiral phase structure on enantioselectivity. *Chirality*, v. 6, n. 2, p. 135-140, 1994.

MIHLBACHLER, K.; KACZMARSKI, K.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.; GUIOCHON, G. Measurement and modeling of the equilibrium behavior of the Tröger's base enantiomers on an amylose-based chiral stationary phase. *J. Chromatogr., A*, 955, p. 35-52, 2002.

MIHLBACHLER, K.; KACZMARSKI, K.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.; GUIOCHON, G. Adsorption behavior of the (\pm)-Troger's base enantiomers in the phase system of a silica-based packing coated with amylose tri(3,5-dimethyl carbamate) and 2-propanol and molecular modeling interpretation. *Journal of Chromatography A*. 1113, p. 148-161, 2006.

NOËL, F.; VOLPATO, N.; RIBEIRO, A.; BOLUTARI, E.; CUPELLO, T. Estudos de bioequivalência para fármacos que apresentam estereoisomerismo. *Infarma*. v. 16, n. 11-12, p. 64-67, 2004.

PÉTER, A.; VÉKES, E.; ARMSTRONG, D. W. Effects of temperature on retention of chiral compounds on a ristocetin A chiral stationary phase. *J. Chromatogr., A*, 958, p. 89-107, 2002.

RIBEIRO A. E.; GRAÇA, N. S.; PAIS, L. S.; RODRIGUES, A. E. Preparative separation of ketoprofen enantiomers: choice of mobile phase composition and measurement of competitive adsorption isotherms. *Sep. Purif. Technol.*, 61, p. 375-383, 2008.

ROJKOVIČOVÁ, T.; LEHOTAY, J.; KRUPČÍK, J.; FEDURCOVÁ, A.; ČIŽMÁRIK, J.; ARMSTRONG, D. W. Study of the mechanism of enantioseparation. VII. Effect of temperature on retention of some enantiomers of phenylcarbamic acid derivatives on a teicoplanin aglycone chiral stationary phase. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 27, n. 11, p. 1653-1671, 2004.

SAMUELSSON, J.; SAJONZ, P.; FORNSTEDT, T. Impact of an error in the hold-up time for correct adsorption isotherm determination in chromatography. I Even a small error can lead to a misunderstanding of the retention mechanism. *J. Chromatogr., A*, 1189, p. 19-31, 2008.

SEIDEL-MORGENSTERN, A. Experimental determination of single solute and competitive adsorption isotherms. *J. Chromatogr., A*, 1037, p. 255-272, 2004.

SUN, S.; YANG, G.; SUN, H.; WANG, D.; LIU, H. Determination and comparison of competitive isotherms by rectangular pulse method and frontal velocity analysis method. *J. Chromatogr., A*, 918, p. 13-23, 2001.

WENG, W.; ZENG, Q.; YAO, B.; WANG, Q.; LI, S. Influence of mobile phase composition on the apparent thermodynamic characteristics in liquid chromatographic enantioseparation on a tartardiamide-based stationary phase. *Chromatographia*, v. 61, n. 11/12, p. 561-566, 2005.

ZABKA, M.; RODRIGUES, A. E. Thermodynamic and kinetic study of adsorption of R,S- α -tetralol enantiomers on the chiral adsorbent CHIRALPAK AD. *Sep. Sci. Technol.*, 426, p. 739-768, 2007.