

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DAS IMPUREZAS TIMINA E TIMIDINA NA MATÉRIA-PRIMA ESTAVUDINA

Gisele Rodrigues da Silva*, Felipe Antonacci Condessa, Gérson Antônio Pianetti, Elzília de Aguiar Nunan e Ligia Maria Moreira de Campos

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

Recebido em 10/10/07; aceito em 24/4/08; publicado na web em 22/9/08

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF THE IMPURITIES THYMINE AND THYMIDINE IN STAVUDINE BULK DRUG. A HPLC method was developed to quantify thymine and thymidine impurities in stavudine bulk drug. The separation was carried out in isocratic mode using methanol/water (20:80) as mobile phase, a C₁₈ column and UV detection at 266 nm. The method provided selectivity based on peak purities and resolution among peaks. It was linear over the range of 0.5-5.0 µg/mL. The quantitation limits were 0.021 µg/mL for thymine and 0.134 µg/mL for thymidine. The average accuracies of three concentrations ranged from 97.06 to 102.61% and precision was close to 1%. The method showed robustness, remaining unaffected by deliberate variations in relevant parameters.

Keywords: HPLC; stavudine; impurities.

INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença infecciosa provocada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). O HIV é um retrovírus com genoma RNA, que necessita, para multiplicar-se, da enzima transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral para DNA, que pode, então, se integrar ao genoma da célula do hospedeiro.¹

As conseqüências clínicas da infecção pelo vírus HIV devem-se à sua capacidade em desarmar o sistema imune, devido à depleção dos linfócitos CD4-positivos (CD4+), tornando o hospedeiro infectado suscetível às infecções oportunistas fatais.¹

O principal objetivo da terapia anti-retroviral é retardar a progressão da imunodeficiência e/ou restaurar, tanto quanto possível, a imunidade, aumentando o tempo e a qualidade de vida da pessoa infectada.²

Um dos fármacos utilizados na terapia anti-retroviral é a estavudina. Trata-se de um inibidor da transcriptase reversa análogo de timidina, um nucleosídeo de ocorrência natural. Ao ser rapidamente fosforilada por enzimas quinases celulares, gera-se um metabólito ativo, o trifosfato de estavudina que, por sua vez, impede a replicação do HIV. Há inibição da enzima transcriptase reversa do HIV por competição com o substrato natural trifosfato de desoxitimidina, resultando na finalização prematura da síntese do DNA viral.³

A timina e a timidina são descritas como sendo as principais impurezas relacionadas à estavudina (Figura 1). A timina é considerada o principal produto de degradação da estavudina. Em estudos de análise térmica, o aquecimento da estavudina, após a fusão, promoveu a decomposição do fármaco e formação da timina como produto principal.⁴ Relatou-se também que a timina é o principal produto da degradação hidrolítica e oxidativa da estavudina.⁵ A timidina pode ser considerada uma impureza de síntese uma vez que é descrita

como sendo um precursor químico utilizado em diferentes rotas de síntese da estavudina.^{6,7}

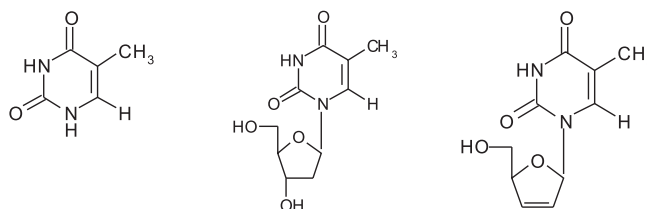


Figura 1. Estruturas químicas da timina, timidina e estavudina

Vários métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção na região do ultravioleta ou por espectrometria de massas, para a quantificação da estavudina, isolada ou associada a outros anti-retrovirais, encontram-se disponíveis na literatura, principalmente envolvendo sua determinação em fluidos biológicos.⁸⁻¹⁵ Também é descrito um método alternativo, por espectrofotometria derivada, para a determinação simultânea de estavudina e lamivudina em dose fixa combinada.¹⁶

Santoro *et al.*¹⁷ desenvolveram e validaram um método por CLAE, em modo isocrático e detecção no ultravioleta (265 nm), para a quantificação simultânea de estavudina e timina em cápsulas.¹⁸ Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS)¹⁸ e a *United States Pharmacopeia*¹⁹ publicaram a monografia de estavudina matéria-prima, na qual está descrito um método para a determinação das impurezas (timina e timidina) presentes na estavudina. Trata-se de um método por CLAE, com eluição em gradiente, cujo tempo de duração é de 40 min.

Apesar dos vários métodos citados para a quantificação da estavudina, constatou-se a ausência de publicações que descrevam um método de CLAE, em modo isocrático, para o controle de qualidade da matéria-prima estavudina, que permita a determinação simultânea das duas principais impurezas, timina e timidina.

*e-mail: gisele_ufmg@yahoo.com.br

No presente trabalho é descrito um método por CLAE, em fase reversa, modo isocrático e detecção no ultravioleta, desenvolvido e validado para a determinação simultânea das principais impurezas (timina e timidina) na estavudina matéria-prima. Pela sua simplicidade e rapidez, o método pode ser aplicado em análises rotineiras de controle de qualidade da matéria-prima estavudina.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Padrões de trabalho

Estavudina (Instituto Vital Brasil S.A., Rio de Janeiro, Brasil – teor: 100,23%), timina (Sigma Aldrich, Alemanha – teor: mínimo de 99%), timidina (Sigma Aldrich, Alemanha – teor: mínimo de 99%).

Reagentes

Metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), água ultrapura obtida por sistema Milli-Q-Plus (Millipore, USA).

Matérias-primas

Estavudina matéria-prima 1 (Labogem S/A Química Fina e Tecnologia, São Paulo, Brasil), estavudina matéria-prima 2 (Shin Sei Kye Chemical Corporation, Coreia).

Equipamentos e condições cromatográficas

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Hewlett Packard, HP 1100, equipado com bomba quaternária HP 1100, forno de coluna, auto-injetor HP 1100, detector UV-Vis DAD HP 1100. Os dados cromatográficos foram analisados usando o programa HP Chem Station. Utilizou-se coluna Merck LiChrospher® capeada C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm d.i.), Lote L647933, mantida a 30 °C. A fase móvel era constituída de mistura de 20 partes de metanol e 80 partes de água ultrapura. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min, o volume de injeção de 20 µL e a detecção em 266 nm.

Método

Solução padrão estoque de timina e timidina

Transferiram-se cerca de 5 mg de timina e 5 mg de timidina para balão volumétrico de 50 mL. Acrescentaram-se 35 mL de água. Deixou-se em banho de ultra-som por 20 min. Completou-se o volume com o mesmo solvente. A solução padrão estoque de timina e timidina apresentou a concentração final de 100 µg/mL, para cada substância.

Solução padrão diluída de timina e timidina

Transferiu-se 1 mL da solução padrão estoque de timina e timidina para balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume com a fase móvel. A solução resultante foi filtrada em membrana de 0,45 µm. A concentração final de 2 µg/mL, para cada substância, foi considerada a concentração de trabalho, o que corresponde ao limite máximo de 0,5% de cada impureza presente na estavudina.

Solução padrão de estavudina, timina e timidina

Transferiram-se cerca de 20 mg de padrão de estavudina para balão volumétrico de 50 mL. Acrescentaram-se, aproximadamente, 35 mL de fase móvel. Deixou-se em banho de ultra-som por 10 min. Transferiu-se 1 mL da solução padrão estoque de timina e timidina para o mesmo balão volumétrico. Completou-se o volume com a fase móvel. A solução resultante foi filtrada em membrana de 0,45 µm. A solução padrão de estavudina, timina e timidina apresentou

as concentrações finais de 400 µg/mL de estavudina e de 2 µg/mL de cada impureza, respectivamente.

Solução padrão de estavudina

Transferiram-se cerca de 20 mg de padrão de estavudina para balão volumétrico de 50 mL. Acrescentaram-se, aproximadamente, 35 mL de fase móvel. Deixou-se em banho de ultra-som por 10 min. Completou-se o volume com a fase móvel. A solução resultante foi filtrada em membrana de 0,45 µm. A concentração final de 400 µg/mL de estavudina foi considerada a concentração de trabalho.

Solução amostra (matéria-prima)

Transferiram-se cerca de 20 mg de estavudina matéria-prima para balão volumétrico de 50 mL. Acrescentaram-se, aproximadamente, 35 mL de fase móvel. Deixou-se em banho de ultra-som por 10 min. Completou-se o volume com a fase móvel. A solução resultante foi filtrada em membrana de 0,45 µm. A solução amostra apresentou concentração final de 400 µg/mL.

Validação

Os parâmetros de validação avaliados foram os designados no Guia *International Conference on Harmonisation (ICH)*,²⁰ para métodos de quantificação de impurezas, a saber, seletividade, linearidade, precisão intra-dia e inter-dias, exatidão, limites de quantificação e de detecção e robustez.

Seletividade

Demonstrou-se a seletividade por meio da completa separação entre os picos do padrão de estavudina, de timina e timidina, análise dos parâmetros cromatográficos: resolução, fator de cauda e fator de retenção e análise da pureza dos picos traçando-se espectros no ultravioleta em cinco pontos diferentes de cada pico.

Linearidade

Transferiram-se alíquotas adequadas da solução padrão estoque de timina e timidina para balões volumétricos de 50 mL de modo a obter, após diluição com a fase móvel, concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250% da concentração de trabalho, estipulada como sendo de 2 µg/mL. As soluções foram injetadas em triplicata. Traçou-se a curva analítica para cada substância. Calcularam-se a equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, o coeficiente de correlação (r) e o intercepto da curva com o eixo Y, e avaliou-se a distribuição normal dos resíduos (teste Shapiro-Wilk).

Precisão

Precisão intra-dia

Prepararam-se 6 soluções padrão diluída de timina e timidina. As soluções foram injetadas em duplicata. A precisão intra-dia foi expressa como o desvio padrão relativo (DPR) das determinações realizadas para cada substância, no 1º dia.

Precisão inter-dias

Prepararam-se 6 soluções padrão diluída de timina e timidina. As soluções foram injetadas em duplicata. A precisão inter-dias foi expressa como o DPR das 12 determinações realizadas para cada substância (reunião dos dados obtidos no 1º e no 2º dia).

Exatidão

Prepararam-se 3 soluções dos padrões de impureza contendo quantidade exatamente pesada de timina e timidina equivalente a 50, 100 e 150% da concentração de trabalho, correspondendo a 1, 2

e 3 µg/mL. Prepararam-se, também, soluções padrão de estavudina, na concentração final de 400 µg/mL, adicionadas de quantidade exatamente pesada de timina e timidina equivalente a 50, 100 e 150% da concentração de trabalho de cada impureza. Prepararam-se três soluções para cada concentração. As soluções foram injetadas em duplicata. A exatidão foi expressa como a porcentagem de recuperação (%RE) dos analitos adicionados à estavudina.

Limites de quantificação e de detecção

Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) para timina e timidina foram estimados utilizando-se os valores de desvio padrão (σ) do intercepto da linha de regressão, a inclinação (s) das curvas analíticas de cada substância e as expressões:

$$LQ = \frac{10\sigma}{s} \quad LD = \frac{3,3\sigma}{s}$$

Robustez

Foram feitas alterações deliberadas nos seguintes parâmetros: fluxo da fase móvel (0,8 e 1,2 mL/min), temperatura (27 e 35 °C) e colunas. Utilizaram-se três colunas, do mesmo lote da indicada em Materiais, denominadas A, B e C e classificadas pelo tempo de uso: A (coluna nova, ainda não utilizada), B (coluna utilizada unicamente no desenvolvimento do método) e C (coluna utilizada por longo tempo em análises diversificadas e de rotina no laboratório). Prepararam-se duas soluções padrão de estavudina, timina e timidina para cada modificação. As soluções foram injetadas em duplicata. Calculou-se a resolução entre os picos de timina e timidina e entre os de timidina e estavudina, após a modificação de cada parâmetro. Realizou-se também a análise de variância (ANOVA de uma classificação $p \leq 0,05$) entre as áreas de timina e timidina obtidas a partir do método validado e das condições cromatográficas alteradas.

Determinação do teor de timina e timidina na estavudina matéria-prima

Prepararam-se soluções amostra das duas matérias-primas (1 e 2) e padrão de estavudina, timina e timidina. As soluções foram injetadas em triplicata. Calculou-se o teor de timina e timidina nas soluções amostra a partir das áreas obtidas com a solução padrão de estavudina, timina e timidina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para iniciar o desenvolvimento do método de separação e quantificação de timina, timidina e estavudina, por CLAE, em fase reversa, foi consultada a monografia da zidovudina descrita na *United States Pharmacopeia*,¹⁹ onde estão relatadas as seguintes condições cromatográficas para a quantificação de zidovudina e timina: coluna C_{18} , fase móvel constituída de metanol e água (20:80), detecção em 265 nm e fluxo de 1 mL/min. Este método foi considerado referencial já que a zidovudina apresenta propriedades físico-químicas semelhantes às da estavudina. A zidovudina é um fármaco anti-retroviral análogo do nucleosídeo timidina. É ligeiramente solúvel em água, o valor de pka é de 9,7 e apresenta máximo de absorção em 266,5 nm em água. A estavudina, por sua vez, é solúvel em água, o valor de pka é de 10 e apresenta máximo de absorção em 266 nm em água.²¹

Considerando estes fatos, decidiu-se aplicar e, em seguida, otimizar, o método anteriormente descrito. A proporção de 20 partes de metanol e 80 partes de água na fase móvel promoveu força de eluição adequada, resultando em baixos tempos de retenção dos analitos, sem provocar prejuízos na resolução. Estabeleceu-se que o comprimento de onda de detecção seria 266 nm, devido à maior absorvidade, nesse

comprimento de onda, da estavudina e de suas substâncias relacionadas. Na Figura 2 está representado o cromatograma da separação de timina, timidina e estavudina nas condições adaptadas.

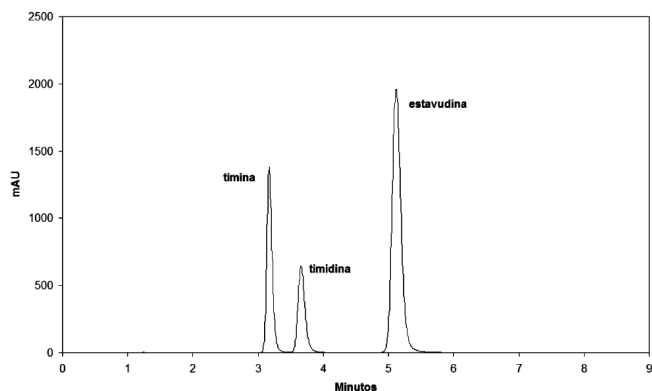


Figura 2. Separação da timina (3,170 min), timidina (3,810 min) e estavudina (5,319 min). Condições: coluna C_{18} , 250 mm x 4 mm, fase móvel MeOH/ H_2O (20:80), fluxo 1,0 mL/min, detecção 266 nm, temperatura 30 °C, volume de injeção 20 µL, cromatógrafo HP 1100

Validação

Seletividade

Os picos cromatográficos (Figura 2) correspondentes à timina, timidina e estavudina apresentaram completa separação em linha de base. Na Tabela 1 estão indicados os valores de resolução entre os picos e os respectivos fatores de cauda e de retenção. A resolução superior a 1,5 atesta a qualidade da separação cromatográfica. Os fatores de cauda próximos da unidade demonstram a simetria dos picos, o que é preferencial para a quantificação inequívoca dos analitos. Os fatores de retenção encontram-se dentro da faixa de 0,5 a 20, demonstrando a força eluente adequada da fase móvel.¹⁵

Tabela 1. Parâmetros cromatográficos demonstrativos da seletividade do método: resolução, fator de cauda, fator de retenção dos picos da timina, timidina e estavudina

Parâmetro cromatográfico	Timina	Timidina	Estavudina
Resolução	-	3,141	6,079
Fator de cauda	1,074	1,036	0,964
Fator de retenção	0,60	0,91	1,7

Foram traçados os espectros no ultravioleta dos picos cromatográficos em 5 pontos diferentes. Todos os espectros de cada substância se sobrepuseram, demonstrando a pureza dos picos e confirmando a seletividade do método.

Linearidade

Na Tabela 2 são apresentadas as equações das curvas analíticas de timina e timidina, calculadas pelo método dos mínimos quadrados. Também constam da tabela os coeficientes de correlação, que foram superiores a 0,999, indicando forte correlação linear entre as concentrações das substâncias e as áreas dos picos. De acordo com as análises estatísticas realizadas, os interceptos não foram diferentes de zero, para o nível de significância de 5% ($p > 0,05$). A avaliação dos resíduos (teste Shapiro-Wilk) demonstrou a distribuição normal dos dados, indicando a adequação do modelo linear ($p > 0,05$). Todos os dados apresentados são demonstrativos da linearidade do método.

Tabela 2. Análises estatísticas demonstrativas da linearidade do método: intervalo linear, equações das curvas analíticas de timina e timidina, coeficientes de correlação e desvios padrões dos interceptos e das inclinações

Parâmetros estatísticos	Timina	Timidina
Intervalo linear	0,5 – 5,0 µg/mL	
Intercepto	-0,1202	0,3220
Inclinação	33,2892	22,4692
Coefficiente de correlação	0,9999	0,9997
Desvio padrão do intercepto	0,0692	0,3014
valor-p intercepto	0,10126	0,30116
Desvio padrão da inclinação	0,0228	0,0993
valor-p inclinação	1,959E-42	1,789E-29

Precisão

Os resultados das precisões intra-dia e inter-dias estão indicados na Tabela 3. Os valores de DPR intra-dia e inter-dias da timina e timidina, próximos a 1%, atestam a precisão do método. Segundo Snyder *et al.*,²² para análise de impurezas presentes em baixas concentrações aceita-se que o valor de DPR não ultrapasse 5 ou 10% dependendo da complexidade da amostra.

Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação da timina e da timidina, nas concentrações 50, 100 e 150% da concentração de trabalho. As recuperações variaram entre 97,06 e 102,61%, nas três concentrações, o que possibilitou demonstrar a exatidão do método (Tabela 4).

Limites de quantificação e de detecção

Os limites de quantificação, para timina e timidina, foram de

0,021 e 0,134 µg/mL, respectivamente, e os de detecção, para timina e timidina, foram de 0,007 e 0,044 µg/mL, respectivamente.

Robustez

As áreas dos picos de timina e timidina obtidas a partir do método validado e em cada parâmetro modificado estão indicadas na Tabela 5. Os valores de resolução entre timina e timidina e entre timidina e estavudina foram sempre superiores ou iguais a 3, indicando que pequenas variações dos parâmetros não alteraram a separação entre os picos.

De acordo com a análise estatística realizada (ANOVA de uma classificação $p \leq 0,05$), não foi verificada diferença estatisticamente

Tabela 3. Média das áreas dos picos de timina e timidina, obtidas em dois dias diferentes e valores de DPR (%) demonstrativos da precisão intra-dia e inter-dias

	Timina	Timidina
Média das áreas (dia 1) (n = 6)	70,79	45,79
DPR intra-dia 1	0,94	0,53
Média das áreas (dia 2) (n = 6)	69,44	45,90
DPR intra-dia 2 (n = 6)	0,62	1,01
DPR inter-dias (dias 1 e 2) (n = 12)	1,26	0,78

Tabela 4. Médias (n = 3) das porcentagens de recuperação da timina e da timidina, nas concentrações 50, 100 e 150% da concentração de trabalho, demonstrativas da exatidão do método

Concentração	Porcentagem de recuperação (n = 3)	
	Timina	Timidina
50%	97,06	98,56
100%	100,89	99,82
150%	98,79	102,61

Tabela 5. Áreas dos picos de timina e timidina obtidos a partir dos parâmetros cromatográficos do método validado e dos parâmetros modificados deliberadamente para demonstrar a robustez do método, e valores de resolução entre timina e timidina e timidina e estavudina

		Áreas timina	Áreas timidina	Resolução TT ¹	Resolução TE ²		
		70,88	46,34	3,3	6,7		
		71,34	46,55	3,3	6,7		
Parâmetros cromatográficos do método validado		70,49	45,32	4,0	7,0		
		70,24	45,21	4,0	7,0		
		71,88	44,77	3,7	7,1		
		71,89	45,72	3,7	7,1		
Parâmetros modificados para avaliar a robustez	fluxo	0,8 mL/min	71,82	46,92	3,7	7,0	
			71,85	46,99	3,7	7,1	
	1,2 mL/min		70,94	45,83	3,2	6,4	
			72,90	45,79	3,2	6,4	
	temperatura	27 °C		70,56	45,28	4,1	7,1
				70,63	44,71	4,0	7,0
35 °C			69,67	45,70	3,0	6,4	
			69,59	45,52	3,0	6,5	
coluna	A		70,67	45,88	3,4	6,7	
			70,70	44,87	3,4	6,6	
			71,88	44,77	3,7	7,1	
	B		71,89	45,72	3,7	7,1	
			70,78	45,99	3,0	6,7	
			70,56	45,80	3,0	6,6	

¹ Resolução TT - resolução entre timina e timidina; ² Resolução TE - resolução entre timidina e estavudina

significativa entre as áreas de timina obtidas a partir do método validado e os parâmetros cromatográficos deliberadamente modificados ($p > 0,05$). Porém, ao se comparar as áreas obtidas utilizando todos os fatores entre si, utilizando como pós-teste, o teste de Tukey, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos com fluxo de 0,8 mL/min e temperatura de 35 °C ($p = 0,0458$). Portanto, a modificação conjunta destes parâmetros cromatográficos (fluxo 0,8 mL/min e temperatura de 35 °C) inviabiliza a obtenção de valores de áreas confiáveis de timina. Em relação à timidina, não se verificou diferença estatisticamente significativa entre as áreas obtidas a partir do método validado e os parâmetros modificados para avaliação da robustez.

Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que o método é robusto, em relação a pequenas e deliberadas alterações de fluxo da fase móvel, temperatura da coluna, colunas e equipamentos.

Determinação do teor de timina e timidina na estavudina matéria-prima

Realizou-se a determinação do teor de impurezas presentes na estavudina, matérias-primas 1 e 2, nas condições do método validado. Os critérios de aceitação utilizados foram os estabelecidos no certificado de análise do fabricante da estavudina matéria-prima 2: máximo de 0,5% para as impurezas individuais e de 1,5% para impurezas totais. Os valores de porcentagem de impurezas determinados pelo método proposto estão indicados na Tabela 6. Observou-se que a matéria-prima 1 apresentou porcentagens de timina e timidina inferiores a 0,5%, e porcentagem de impurezas totais inferior a 1,5%, incluindo timina e timidina. Já a matéria-prima 2 apresentou porcentagem de timina de 0,57%, superior ao máximo permitido de 0,5%.

Tabela 6. Porcentagens de timina, timidina, e impurezas totais presentes na estavudina matérias-primas 1 e 2

	Porcentagem de impurezas		
	Timina	Timidina	Totais
Matéria-prima 1	0,35	0,14	0,56
Matéria-prima 2	0,57	0,00	0,57

CONCLUSÃO

Desenvolveu-se e validou-se um método por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação simultânea de timina e timidina, principais impurezas da estavudina. O método em fase reversa e modo isocrático demonstrou confiabilidade por ser rápido, seletivo, linear, preciso, exato e robusto, podendo ser aplicado em análises rotineiras do controle de qualidade da matéria-prima farmacêutica, estavudina.

REFERÊNCIAS

- Goldman, L.; Bennet, J. C.; *Cecil tratado de medicina interna*, 21ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001.
- <http://www.aids.gov.br>, acessada em Agosto 2007.
- United States Pharmacopeial Convention; *Drug information for the health care professional*, 20th ed., Englewood: Micromedex, 2000.
- Gandhi, R. B.; Bogardus, J. B.; Bugay, D. E.; Perrone, R. K.; Kaplan, M. A.; *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, 201, 221.
- Dunge, A.; Chakraborti, A. K.; Singh, S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 35, 965.
- Lipshutz, B. H.; Stevens, K. L.; Lowe, R. F.; *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2711.
- <http://www.fda.gov/cder>, acessada em Agosto 2007.
- Sarasa, M.; Riba, N.; Zamora, L.; Carné, X.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2000**, 746, 183.
- Burger, D. M.; Rosing, H.; Van Gijn, R.; Meenhorst, P. L.; van Tellinger, O.; Beijnen, J.H.; *J. Chromatogr.* **1992**, 584, 239.
- Rezk, N. L.; Tidwell, R. R.; Kashuba, A. D. M.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, 791, 137.
- Simon, V. A.; Thiam, M. D.; Lipford, L. C.; *J. Chromatogr., A* **2001**, 913, 447.
- Huanga, Y.; Zurlinden, E.; Lin, E.; Li, X.; Tokumoto, J.; Golden, J.; Murre, A.; Engstrom, J.; Conte Jr., J.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, 799, 51.
- Bezy, V.; Morin, P.; Couerbe, P.; Leleu, G.; Agrofoglio, L.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, 821, 132.
- Mistri, H. N.; Jangid, A. G.; Pudage, A.; Gomes, N.; Sanyal, Ma.; Shrivastav, P.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, 853, 320.
- Verweij-van, W. C. P. W. G. M.; Aarnoutse, R. E.; Burger, D. M.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, 816, 121.
- Kapoor, N.; Khandavilli, S.; Panchagnula, R.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 41, 761.
- Santoro, M. I. R. M.; Taborianski, A. M.; Singh, A. K.; Kedor-Hackmann, E. R. M.; *Quim. Nova* **2006**, 29, 240.
- http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/QAS_123rev2_Stavudine_mono_FINAL07.pdf, acessada em Dezembro 2007.
- The United States Pharmacopeia*; 30th ed., Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.
- International Conference on Harmonization (ICH); *Topic Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, Proceedings of the Commission of European Communities*, 1996.
- Merck & Co. Inc.; *The Merck Index*, 12th ed, WhiteHouse Station: New Jersey 1996.
- Snyder, R. L.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; *Practical HPLC method development*, 2 ed., Wiley Interscience: New York, 1997.