

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}

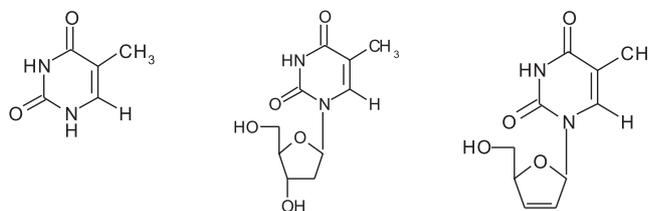


Figura 1. Estruturas químicas da timina, timidina e estavudina

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, decidi-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.

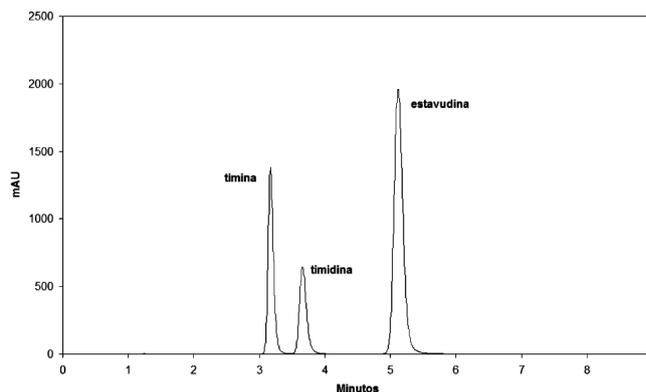


Figura 2. Separação da timina (3,170 min), timidina (3,810 min) e estavudina (5,319 min). Condições: coluna C_{18} , 250 mm x 4 mm, fase móvel MeOH/ H_2O (20:80), fluxo 1,0 mL/min, detecção 266 nm, temperatura 30 °C, volume de injeção 20 µL, cromatógrafo HP 1100

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
Parâmetros cromatográficos do método validado		70,88	46,34	3,3	6,7
		71,34	46,55	3,3	6,7
		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		Áreas timina	Áreas timidina	Resolução TT ¹	Resolução TE ²
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
	B	71,88	44,77	3,7	7,1
		71,89	45,72	3,7	7,1
	C	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.