

Validación del método colorimétrico de bifenilo para la determinación del contenido de carbohidratos en el polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 5

Jennifer Caridad Abreu-Vázquez* ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-1374-0451>

Janet Zita Pérez-Herrera ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-1254-8478>

Aida Yaima Merchán-Miliá ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-1065-9683>

* Instituto Finlay de Vacunas, La Habana, Cuba.

Autor correspondiente: jabreu@finlay.edu.cu

Streptococcus pneumoniae se encuentra entre los mayores patógenos causantes de infecciones invasoras y no invasoras en los dos extremos de la vida: niños menores de 5 años y personas mayores de 65 años de edad. El Instituto Finlay de Vacunas inició el "Proyecto Neumococo", consistente en la concepción y desarrollo de la vacuna Quimi-Vio® (vacuna antineumocócica) cuya composición incluye 2 µg de polisacáridos de los serotipos 1, 5, 14, 18C, 19F, 23F y 4 µg del 6B conjugados con toxoide tetánico adsorbido sobre fosfato de aluminio. La validación de los métodos que permitan identificar y cuantificar los principios activos (polisacáridos capsulares en este caso) presentes en las formulaciones están dentro de los requisitos obligatorios para la liberación final del producto. Durante el proceso de control de calidad de estos polisacáridos, se evalúa el contenido o concentración de carbohidratos, que en el caso de los serotipos 1 y 5 se realiza mediante el método colorimétrico de bifenilo (m-hidroxibifenil). El presente trabajo tuvo como objetivo la validación del procedimiento analítico basado en el método de bifenilo para cuantificar carbohidratos en polisacáridos capsulares purificados de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 5, debido a la importancia de contar con un método de cuantificación de carbohidratos validado que permita ser aplicado en el control de calidad de estos ingredientes farmacéuticos activos. Se empleó una solución estándar de ácido galacturónico a 1 mg/mL preparada a partir de un Material de Referencia de Trabajo, ácido galacturónico lote AG (1)/18 para la preparación de la curva de calibración. Se realizó una evaluación de los parámetros de validación: linealidad, exactitud, precisión y especificidad, según exigencias actuales. El método de bifenilo fue específico, lineal, exacto y preciso en el rango de 0,005-0,10 mg/mL puesto que se cumplieron satisfactoriamente los criterios de aceptación establecidos para cada uno de ellos. El método colorimétrico de bifenilo o m-hidroxibifenilo resultó válido para el control de calidad de las muestras de polisacárido capsular purificado de *Streptococcus pneumoniae* evaluado, brindando resultados confiables.

Palabras clave: estudio de validación; colorimetría; *Streptococcus pneumoniae*.

Introducción

Streptococcus pneumoniae se encuentra entre los mayores patógenos causantes de infecciones invasoras y no invasoras en los dos extremos de la vida: en niños menores de 5 años y en personas mayores de 65 años de edad. Las principales manifestaciones asociadas a infecciones neumocócicas son: neumonía, bacteriemia febril, septicemia, otitis media y meningitis.⁽¹⁾

Uno de los factores de riesgo de la infección neumocócica en niños es la falta de inmunización. La

Organización Mundial de la Salud recomienda la inclusión de vacunas antineumocócicas conjugadas en los programas de inmunización infantil, dirigidas a los serotipos más prevalentes a nivel mundial. Estas vacunas garantizan la protección contra dicho patógeno causante de las enfermedades antes mencionadas.⁽²⁾

La primera vacuna neumocócica fue elaborada en 1911 a partir de células enteras. Posteriormente, otros investigadores llevaron a cabo ensayos clínicos para evaluar la eficacia y seguridad de vacunas basadas en

* Tecnólogo II Nivel, Departamento de Análisis Físico-Químico, Dirección de Control de la Calidad, Instituto Finlay de Vacunas, La Habana, Cuba.

polisacáridos capsulares de diferente número de serotipos (6, 14 y 23 serotipos).⁽³⁾

Se ha observado que las vacunas que contienen sólo polisacáridos son poco inmunogénicas, que la inmunidad decrece con el tiempo y que proporcionan poca memoria inmunológica tras dosis repetidas debido a que los polisacáridos inducen una respuesta timo-independiente. Para mejorar esto se desarrollaron las vacunas conjugadas en las cuales se une el polisacárido a una proteína transportadora que permite estimular los linfocitos T y, por tanto, mejorar la inmunidad logrando que sea del tipo timo-dependiente. Esta conjugación se ha utilizado en diferentes vacunas como son las vacunas frente a *Streptococcus pneumoniae* (VCP-7v) y frente a *Neisseria meningitidis* C, entre otras, siendo las proteínas utilizadas para unirse al polisacárido el toxoide tetánico o el complejo proteico de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*.⁽⁴⁾

El Instituto Finlay de Vacunas (IFV), desarrolla la vacuna conjugada antineumocócica polisacarídica Quimi-Vio[®] cuya composición incluye polisacáridos conjugados con toxoide tetánico adsorbido sobre fosfato de aluminio como adyuvante. Los métodos que permiten identificar y cuantificar los principios activos (polisacáridos capsulares) presentes en esta formulación, están dentro de los requisitos obligatorios para la liberación final del producto. La autoridad regulatoria cubana (CEDMED) recomienda para estos fármacos, que la prueba de identidad se realice por técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) o inmunoquímicas como western blot y dot blot.^(5,6) Para la cuantificación de su ingrediente farmacéutico activo (IFA), la Farmacopea Europea, en 2011, recomendó el empleo del método colorimétrico del carbazol para la determinación del contenido de ácido urónico en los polisacáridos capsulares purificados de *Streptococcus pneumoniae*.⁽⁷⁾ Este método tiene como desventajas el consumo de una mayor cantidad de muestra y de tiempo de procesamiento. Sin embargo, el método colorimétrico m-hidroxibifenil desarrollado por Blumenkrantz y Asboe-Hansen, en el año 1973,⁽⁸⁾ permite una disminución en la cantidad de muestra a emplear, y su procedimiento es mucho más rápido. El método del m-hidroxibifenil previamente validado por Pérez-Calixto y colaboradores,⁽⁹⁾ en la cuantificación de ácido urónico en

muestras de polisacárido purificado de *Streptococcus pneumoniae* en el IFV, brinda resultados comparables al de carbazol, reportado en la Farmacopea Europea,⁽⁷⁾ resultado de gran importancia porque posibilita su aplicación.

En el IFV, durante el control de calidad de estas IFAs, se realiza la determinación de la identidad mediante el método inmunoquímico de dot-blot y la cuantificación del contenido de carbohidratos mediante el método colorimétrico de bifenilo (m-hidroxibifenil) desarrollado por Blumenkrantz y Asboe-Hansen⁽⁸⁾ para los serotipos 1 y 5, basado en la hidrólisis del polisacárido capsular de neumococo de ambos serotipos por la acción del tetraborato de sodio en H₂SO₄ concentrado y calor, con la posterior reacción con m-hifroxibifenilo formando un compuesto de color rosado soluble en agua que exhibe su máxima absorbancia a 520 nm.

Las Buenas Prácticas de Producción constituyen un conjunto de regulaciones y requisitos que aseguran la idoneidad de los métodos, las instalaciones y los controles para la fabricación de medicamentos. De estas se deriva, que todos los procedimientos analíticos empleados para análisis deben ser adecuados para el uso al que están destinados. Esto se demuestra por validación, la cual consiste en el establecimiento de pruebas documentales que aportan un alto grado de seguridad, de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados.⁽¹⁰⁾ Por tanto, el proceso de validación de los métodos analíticos es imprescindible para asegurar la confiabilidad de los resultados y cumplir con los requerimientos de las Buenas Prácticas de Producción para la Fabricación de Productos Farmacéuticos y en especial de las vacunas para uso humano. El objetivo del presente trabajo fue la validación del método colorimétrico de bifenilo para la cuantificación de carbohidratos en polisacáridos capsulares purificados de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 5, el cual constituye el método establecido para la cuantificación de carbohidratos en dichas IFAs en el IFV.

Materiales y Métodos

Muestras

Para realizar la validación del método analítico fueron utilizados tres lotes de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 5, purificados en la Planta de Producción de IFAs del IFV. Esta IFA presentó características organolépticas adecuadas (granulado blanco o cremoso y que después de resuspendido forma una disolución transparente o con ligera turbidez) según su especificación de calidad (ESPE 02-143) en el IFV.

Preparación de las muestras

El polisacárido capsular purificado seco serotipo 5 fue previamente analizado y determinado su porcentaje de humedad y peso seco en el laboratorio de Materias Primas de la Dirección de Calidad del IFV, se disolvió en agua purificada, hasta una concentración de 5 mg/mL. Posteriormente se le realizó una dilución 1/25, y se tomaron 200 µL por triplicado para realizar el ensayo.

Preparación de la curva de calibración

Se utilizó 1 bulbo de material de referencia de ácido galacturónico lote AG (1)/18, elaborado y caracterizado previamente por el laboratorio de Materiales de Referencia de la Dirección de Calidad del IFV.

El material de referencia se resuspendió en 9,6 mL de agua purificada, para obtener la solución estándar (SE) de ácido galacturónico a 1 mg/mL. Se adicionaron alícuotas de 5, 10, 20, 40, 80 y 100 µL de la SE a viales, y se completó a 1 mL con agua purificada. Se tomaron 200 µL por triplicado de cada una de las soluciones preparadas anteriormente y se adicionaron a tubos de ensayo, para obtener 0,005; 0,010; 0,020; 0,040; 0,080 y 0,100 mg/mL respectivamente de ácido galacturónico en cada punto de la curva.

Método analítico

Los tubos de ensayo conteniendo 200 µL de la curva de calibración, el blanco y las muestras, se introdujeron en un baño de agua helada. Se le adicionó a cada tubo 1,2 mL de una solución al 0,48 % de tetraborato de sodio decahidratado (Merck, Alemania) (0,96 g) en H₂SO₄ concentrado (Merck, Alemania) (95-98 %), se agitó

vigorosamente, y se colocaron en un baño de agua a 100 °C durante 5 min, luego se extrajeron y se dejaron enfriar en un baño de agua helada. A continuación, se añadieron 20 µL de la solución de bifenilo (m-hidroxibifenil) (Sigma-Aldrich, Alemania) en NaOH (Panreac-Applichem, Alemania) a todos los tubos excepto al blanco al que se le añadió 20 µL de una solución de NaOH 0,5 %. Se agitó hasta la aparición de una coloración rosada y se dejó reposar 5 min, posteriormente se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda 520 nm según se describe en el PNO 12-577 de la Dirección de Calidad del IFV.

Validación del método analítico

El método de ensayo se clasifica dentro de la categoría de ensayos de contenido/potencia (métodos analíticos para la cuantificación del fármaco o de los principios activos, incluyendo los preservos). Para su validación se evaluaron los parámetros de precisión (precisión intermedia y repetibilidad), exactitud, linealidad y especificidad.^(10,11)

Precisión

Repetibilidad

Se tomó una muestra homogénea de cada uno de los lotes de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 5 en estudio. A seis réplicas de cada lote, se les realizó la determinación del contenido de carbohidratos por el método de bifenilo por un mismo analista, bajo las mismas condiciones de operación, a un solo nivel de concentración de la muestra (100 %). Se determinó el coeficiente de variación (CV) entre los valores de concentración de carbohidrato obtenidos para cada una de las muestras ensayadas.^(10,11)

Precisión Intermedia

Se realizó con tres réplicas de cada lote de serotipo 5, evaluadas por dos analistas, con soluciones preparadas por cada uno en días diferentes. El ensayo se realizó a un solo nivel de concentración (100 %). Se determinó el CV entre los valores de concentración de carbohidrato para cada una de las muestras ensayadas y se compararon los resultados obtenidos por ambos

analistas mediante una prueba de intervalo de confianza para dos varianzas utilizando el método de Levene ($p \geq 0,05$).^(10,11)

Exactitud

Se realizó por triplicado a partir de tres muestras preparadas de forma independiente de los lotes, cargadas con 1 mg de ácido galacturónico, a partir de la SE de ácido galacturónico de referencia de concentración (1 mg/mL).^(10,11) Se determinó el intervalo de confianza de los valores de concentración hallados, así como el CV de los porcentajes de recobrado obtenidos para cada una de las muestras estudiadas. Se aplicó la prueba *t Student* para comparar el recobrado medio y la concentración esperada, realizándose una prueba de igualdad de varianza por el método de Bonferroni ($p \geq 0,05$).

Linealidad

Se analizaron tres curvas de calibración preparadas en tres días diferentes, se determinó el CV entre los valores de absorbancia de los puntos de la curva, así como el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de correlación (R).^(10,11)

Especificidad

Se utilizaron tres muestras de polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F, el cual no presenta en su estructura grupos funcionales detectables por este método. A tres réplicas de estas muestras se les realizó la determinación de carbohidrato por el método de bifenilo. En este parámetro se evaluó la capacidad del método para identificar solo el analito de interés.⁽¹⁰⁾

Resultados y Discusión

Precisión

Repetibilidad

Durante la evaluación de la repetibilidad (Tabla 1), en todos los casos se obtuvo un CV menor del 3 % lo que cumple con el criterio de aceptación establecido para métodos físico-químicos (5 %)^(10,11), demostrándose que la repetibilidad del método es buena bajo nuestras condiciones de trabajo.

Tabla 1. Evaluación de la repetibilidad.

Lote	Media C (mg/mL) $\pm$ 2 DS	CV %
31 EPCSP5-201	2,656 $\pm$ 0,0045	2,75
31 EPCSP5-202	2,811 $\pm$ 0,0047	2,69
31 EPCSP5-203	2,844 $\pm$ 0,0051	2,74

C: concentración. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación

Tabla 2. Evaluación de la precisión intermedia.

Lote	Media C (mg/mL) $\pm$ 2 DS	CV %	p
31 EPCSP5-201	2,469 $\pm$ 0,0071	3,5	0,939
31 EPCSP5-202	2,660 $\pm$ 0,0068	3,2	0,306
31 EPCSP5-203	2,601 $\pm$ 0,0134	4,5	0,931

C: concentración. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación

Precisión intermedia

Para los lotes evaluados, los CV obtenidos en la precisión intermedia entre los dos analistas cumplieron con el criterio de aceptación ($< 5 \%$)^(10,11) lo que sugiere que el método analítico es preciso (Tabla 2), pues se obtuvieron resultados satisfactorios independientemente del día en que se efectuó el ensayo. Además, al analizar los resultados mediante la prueba de intervalo de confianza para dos varianzas utilizando el método de Levene se obtuvieron valores de $p > 0,05$ para todos los lotes evaluados, pudiendo inferir que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos analistas.

Exactitud

Este parámetro se analizó mediante el método de adición de patrón, en el cual se tomaron alícuotas de las muestras de cada lote y se les añadió cantidades conocidas (1 mg) de la SE de referencia para así obtener la muestra cargada, dejando una alícuota de cada lote sin cargar (muestra sin cargar), a partir de la cual se calculó la concentración (conc.) teórica esperada mediante la fórmula:

Conc. teórica o esperada = conc. muestra sin cargar + 1 mg de ácido galacturónico añadido

Dichas muestras se analizaron en paralelo.

Posteriormente se calculó el porciento de recobro (% R) mediante la fórmula:

$$\% R = (\text{Conc. muestra cargada} / \text{Conc. muestra sin cargar}) * 100$$

Al evaluar la recuperación mediante los % R, se obtuvieron resultados dentro del rango establecido (97-103 %)^(9,10) y el intervalo de confianza estuvo entre 98,72-102,59. Los CV fueron inferiores al 5 %, cumpliendo con el criterio de aceptación.⁽¹⁰⁾ La prueba *t Student*, según el análisis de igualdad de varianza del método de Bonferroni, indicó que no existían diferencias significativas entre los resultados del recobrado y la concentración esperada para los tres

lotes evaluados ($p > 0,05$), resultados comparables con los obtenidos previamente por Pérez Calixto y colaboradores.⁽⁹⁾

El cumplimiento de todos los criterios establecidos al procesar los resultados de las muestras cargadas, demostró la correlación entre la concentración teórica o esperada y la experimental. Esto indica que el método es exacto, y permite obtener valores experimentales muy próximos al valor verdadero (Tablas 3 y 4).

Linealidad

Durante el estudio de la linealidad, al analizar los gráficos de las curvas de calibración, se obtuvo un R promedio y un R^2 promedio superiores a los establecidos

Tabla 3. Concentración de carbohidrato en muestras sin cargar.

Lote	Conc. (mg/mL) media	DS	CV	Conc. teórica (mg/mL)
31-EPCSP5-201	2,47	0,0330	1,35	3,47
31-EPCSP5-202	2,70	0,0403	1,49	3,70
31-EPCSP5-203	2,57	0,0215	0,83	3,57

Conc: concentración. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

Tabla 4. Evaluación de la exactitud. Concentración de carbohidrato en muestras cargadas. Determinación de % R.

Lote	Conc. (mg/mL) media	% R media	DS	CV	Intervalo de confianza	p
31-EPCSP5-201	3,55	102,4	1,113	1,09	98,72-102,59	0,778
31-EPCSP5-202	3,73	100,8	3,411	3,38	98,72-102,59	0,418
31-EPCSP5-203	3,53	98,8	1,566	1,59	98,72-102,59	0,859

Conc: concentración. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación. R: recobro.

Tabla 5. Evaluación de la linealidad.

Puntos de las curvas	C (mg/mL)	DO media	DS	CV (%)		
1	0,005	0,066	0,001	1,741	R (media)	=0,9982
2	0,010	0,132	0,004	2,779	R² (media)	=0,9964
3	0,020	0,270	0,003	1,188		
4	0,040	0,548	0,010	1,906		
5	0,080	1,030	0,016	1,572		
6	0,100	1,215	0,048	3,946		

C: concentración. DO: densidad óptica. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación. R: coeficiente de correlación. R^2 : coeficiente de determinación.

Tabla 6. Evaluación de la especificidad.

Muestra serotipo 23F	DO media	C (mg/mL) media	Muestra serotipo 5	DO media	C (mg/mL) media
31 EPCSP23F-901	0,002	No cuantificable	31-EPCSP5-201	0,338	2,47
31 EPCSP23F-902	0,003	No cuantificable	31-EPCSP5-202	0,353	2,70
31 EPCSP23F-903	0,002	No cuantificable	31-EPCSP5-203	0,337	2,57

C: concentración. DO: densidad óptica.

en el criterio de aceptación,^(10,11) (Tabla 5) confirmando la linealidad de las tres experiencias realizadas en días diferentes, lo que avala la proporcionalidad existente entre la respuesta analítica y la concentración del analito en el rango analizado de 0,005-0,1 mg/mL.

Especificidad

Al analizar la especificidad, se observó que en las muestras de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 23F no se obtuvo respuesta cuantificable, puesto que en su estructura no presenta grupos funcionales (ácido urónico) detectables por el método de bifenilo, en cambio, sí se obtuvo respuesta para las muestras de polisacárido serotipo 5 involucrados en esta validación (Tabla 6), lo que indica que el método es específico, pues la respuesta corresponde exclusivamente al analito de interés sin interferencias de otro serotipo, excipientes, productos de degradación y/o impurezas.⁽¹⁰⁾

Conclusiones

Cada parámetro evaluado en esta validación cumple con los criterios de aceptación establecidos, obteniéndose resultados confiables bajo nuestras condiciones de trabajo. El método resultó válido y posibilita su aplicación para el control de calidad de polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 5 en el IFV.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría

Jennifer Caridad Abreu-Vázquez: redactó el protocolo de la validación, realizó el trabajo experimental, el análisis de datos, redactó el informe final y el manuscrito.

Janet Zita Pérez-Herrera: realizó el ensayo para evaluar la precisión intermedia.

Aida Yaima Merchán-Miliá: realizó la revisión final del manuscrito.

Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este manuscrito.

Referencias

1. Xu Han, Haiyang Yu, Toledo-Romani ME. Vacunas antineumocócicas conjugadas: una revisión de las consideraciones éticas e impacto socio-económico. Rev haban cienc méd. 2021;20(4): e3867. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v20n4/1729-519X-rhcm-20-04-e3867.pdf>. (Consultado en línea: 19 de febrero de 2024).
2. WHO. Pneumococcal vaccines: WHO position paper on their use in community outbreak settings. Wkly Epidemiol Rec. 2021;13:105-10. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/340536/WER96013-105-110-eng-fre.pdf?sequence=1>. (Consultado en línea: 19 de febrero de 2024).
3. Campins Martí M. Vacunas antineumocócicas. Nuevas vacunas conjugadas para el adulto. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015;33(9):617-24. doi: <https://10.1016/j.eimc.2015.09.002>.
4. Pineda Solas V. Vacunas conjugadas. Rev Pediatr Aten Primaria. 2005;7 Supl 4:S65-74. Disponible en: <https://pap.es/files/1116-494-pdf/519.pdf>. (Consultado en línea: 6 de marzo de 2024).
5. Cabrera O, Pisonero M, Rodríguez M, Pérez R, González E, Pedroso J, et al. Dot blot para identidad del polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14 y toxoide tetánico en vacunas conjugadas. Cumbres. 2016; 2(2):31-7. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6550719>. (Consultado en línea: 6 de marzo de 2024).
6. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Requisitos para la liberación de lotes de vacunas. Regulación No.19-2000. La Habana: CECMED; 2000.

7. Dirección Europea de la Calidad de los Medicamentos y de la Asistencia Sanitaria (EDQM). Farmacopea Europea. Estrasburgo: EDQM; 2011.
8. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem*. 1973;54(2):484-9.
9. Pérez- Calixto M, Suárez-Pérez Y, González-Rodríguez H, Achong-García L, Borrell-Castillo Y. Validación del método m-hidroxibifenilo para la cuantificación de ácido urónico en polisacáridos purificados de *Streptococcus pneumoniae*. *Rev cubana Farm*. 2015; 49(2):232-44. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v49n2/far05215.pdf>. (Consultado en línea: 6 de marzo de 2024).
10. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Resolución CECMED No. 40/2014: Anexo No.1 de las Buenas Prácticas para Laboratorios de Control de Medicamentos. Validación de Métodos Analíticos. La Habana: CECMED; 2014.
11. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Regulación no. 37-2012 Buenas prácticas de laboratorio para el control de medicamentos. La Habana: CECMED; 2012.

Validation of the biphenyl colorimetric method for the determination of carbohydrate content in capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* serotype 5

Abstract

Streptococcus pneumoniae is among the major pathogens that cause invasive and non-invasive infections at both ends of life: in children under 5 years of age and in people over 65 years of age. The Finlay Vaccine Institute initiated the "Pneumococcus Project", consisting of the conception and development of the Quimi-Vio[®] vaccine (pneumococcal vaccine) whose composition includes 2 µg of polysaccharides of serotypes 1, 5, 14, 18C, 19F, 23F and 4 µg of 6B conjugated with tetanus toxoid adsorbed on aluminum phosphate. The validation of the methods that allow the identification and quantification of the active ingredients (capsular polysaccharides in this case) present in the formulations are within the mandatory requirements for the final release of the product. During the quality control process of these polysaccharides, the content or concentration of carbohydrates is evaluated, which in the case of serotypes 1 and 5 is carried out using the biphenyl assay (m-hydroxybiphenyl colorimetric method). The objective of this work was to validate the biphenyl method to quantify carbohydrates in purified capsular polysaccharides from *Streptococcus pneumoniae* serotype 5, due to the importance of having a validated carbohydrate quantification method that allows it to be applied in quality control of pneumococcus active pharmaceutical ingredients. A standard solution of galacturonic acid at 1 mg/mL prepared from a Working Reference Material, galacturonic acid batch AG (1)/18, was used for the preparation of the calibration curve. An evaluation of the validation parameters was carried out: linearity, accuracy, precision and specificity, according to current requirements. The biphenyl method was specific, linear, exact and precise in the range of 0.005 - 0.10 mg/mL since the acceptance criteria established for each of them were satisfactorily met. The biphenyl or m-hydroxybiphenyl colorimetric method was valid for quality control of the purified capsular polysaccharide samples of *Streptococcus pneumoniae* evaluated, giving reliable results.

Keywords: validation; colorimetry; *Streptococcus pneumoniae*.
