

LOS COMIENZOS DE LA DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DE LA HEMOGLOBINA EN LA SANGRE: ¿INNOVACIÓN O EVOLUCIÓN?

LLUÍS GARRIGÓS OLTRA

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ALCOI.

lfgarrig@fis.upv.es

Palabras clave: *colorimetría, espectroscopia, química clínica, química analítica, siglo XIX*

The beginnings of colorimetric analysis of haemoglobin in blood: Innovation or evolution?

Summary: *This is a short history of the beginnings of colorimetric analysis of haemoglobin in blood specially of instruments used for the development of these methods.*

Key words: *colorimetry, spectroscopy, clinical chemistry, analytical chemistry, 19th century*

Introducción

La publicación en 1852 de una serie de tres artículos firmados por Karl Vierordt en la revista *Archives für Physiologie* marca el comienzo de las técnicas de «cuento» en los análisis de sangre, las cuales, en esencia, pretendían establecer la riqueza de glóbulos rojos por unidad de volumen de la sangre considerada; a tal fin fueron diseñados un conjunto de instrumentos denominados genéricamente «hemocitómetros». La evolución de estos instrumentos a lo largo del siglo XIX fue estudiada

en 1964 por M. L. Verso, quien incluye en este grupo de instrumentos los fundamentados en comparaciones turbidométricas (Verso, 1964: 153, 155), aunque no aporta noticia alguna sobre los utensilios de base colorimétrica,¹ instrumentos que se diseñaron para la práctica cotidiana en los hospitales y en los que la disyuntiva entre precisión y rapidez se decantó por esta segunda opción, surgiendo diseños como los de Mantegazza, Hoppe-Seyler, Malassez, Hayem o Henocque, capaces de determinar con suficiente precisión la riqueza en glóbulos rojos de una determinada sangre mediante técnicas rápidas y enormemente sencillas. Aunque dos de estos instrumentos han sido recientemente descritos (Garrigós *et al.*, 2006: 252-253, 289-280), dicha reseña no agota la cuestión planteada. La presente comunicación pretende completar en lo posible la información proporcionada en la mencionada relación previa.

Opacidad de la sangre y riqueza en glóbulos rojos: primeros intentos de relacionar el color de la sangre con su constitución

Las tentativas encaminadas a determinar la cantidad de glóbulos rojos por unidad de volumen de sangre a partir de las propiedades ópticas de una determinada muestra arrancan en 1843, cuando Alfred Donné propuso la idea de que la concentración de grasa en la leche se debía a los glóbulos blanquecinos y opacos contenidos en ella; idea que desarrolló en la práctica mediante el diseño de un instrumento que determinaba el espesor mínimo de una capa de leche para que la muestra fuera opaca a unas determinadas condiciones de iluminación ambiental, concretadas en la no percepción de la luz de una candela situada a un metro de distancia del observador (Garrigós *et al.*, 2006: 276-279). Esta hipótesis —la de la opacidad de una capa líquida como consecuencia de la presencia de glóbulos de materia— aplicada a la sangre fue explotada por Paolo Mantegazza, quien en 1865 presentó su globulímetro,² instrumento que es morfológicamente idéntico al lactoscopio de Donné, según se puede apreciar en las figuras 1a y 1b; si bien la determinación de la opacidad del líquido de ensayo se realiza por un procedimiento diferente: en el caso del lactoscopio de Donné el punto final se logra incrementando el espesor de la capa de leche interpuesto entre la luz y el observador (para ello el recipiente que contiene la muestra —un cilindro de caras plano-paralelas— se halla limitado por dos láminas de vidrio que pueden aproximarse mediante un sistema de tornillo micrométrico); en el globulímetro de Mantegazza, si bien el espesor de la capa de disolución sanguínea puede variar igualmente, se suele mantener una distancia fija de 2,5 mm, considerada como óptima para la realización de las medidas, por lo que la opacidad se consigue interponiendo vidrios azules, todos ellos de idéntica coloración y del mismo espesor, entre el depósito de la muestra y la bujía. El argumento central es que

1. Curiosamente en un trabajo posterior (Verso, 1971: 64) destaca la aportación de Joseph Lovibond al desarrollo de la hematología.

2. Según señala el propio autor, el instrumento fue construido en los talleres Dell'Acqua.

cuando más transparente sea la sangre, es decir, cuanta menos cantidad de glóbulos rojos contenga, mayor será el número de vidrios azules que será necesario interponer para lograr la condición de opacidad al observar una candela situada a 1 metro del observador en una habitación a oscuras.

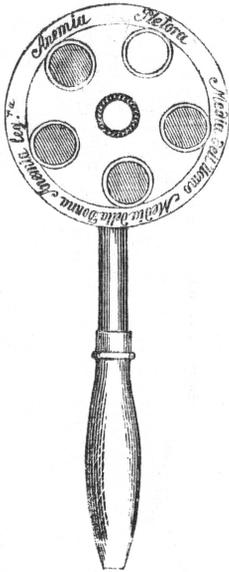


Figura 1a. Globulímetro de Mantegazza (1865).

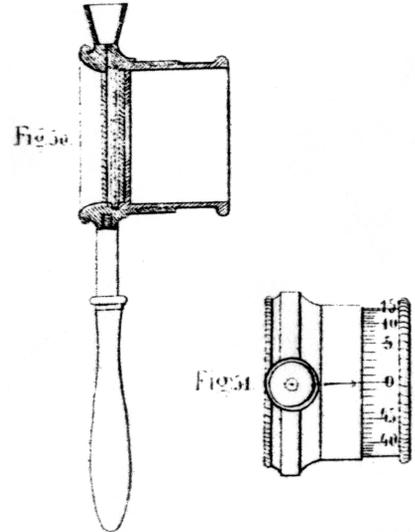
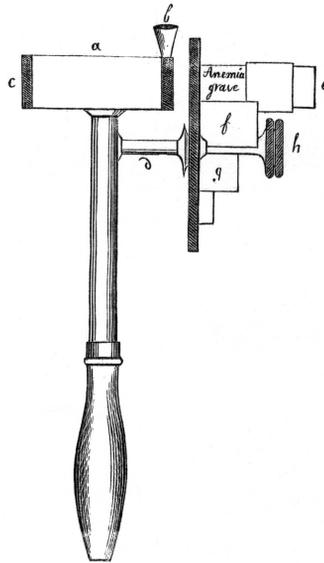


Figura 1b. Lactoscopio de Donné (1843), según Chevalier (1854-1855).

Según se aprecia en las figuras 1a y 1b, el instrumento de Mantegazza constaba de un recipiente limitado en sus extremos por dos vidrios transparentes, uno fijo y el otro móvil, como ya se ha dicho, desplazándose uno dentro del otro por fricción. En la parte superior de dicho recipiente existía un pequeño embudo por donde se introducía la muestra, la cual estaba constituida por sangre diluida, siempre a un valor constante, en una solución alcalina.³ Por delante del recipiente existía un disco, capaz de girar alrededor de un eje central, al que se le habían practicado cinco aberturas también circulares, las cuales podían ser sucesivamente situadas delante del recipiente al ir girando el disco. El recipiente se hallaba sustentado por un mango al cual se sujetaba también el eje del disco giratorio.

Normalmente, el aparato se empleaba para determinaciones rápidas, aunque poco precisas, ya que permitía estimar en poco tiempo valores medios de la riqueza de una sangre en glóbulos rojos. Para ello, cada uno de estos orificios, a excepción del denominado Pletora,

3. Las muestras se preparaban diluyendo 1 gramo de sangre con 96 centímetros cúbicos de una disolución de carbonato sódico en agua que contenía una parte de sal por cada dos de agua.

estaba dotado de un conjunto fijo de láminas de vidrio azul, todas ellas de idéntica coloración y de idéntico espesor, habiéndose calibrado las láminas de manera que cada una de ellas correspondiera a una riqueza de 125.000 glóbulos rojos por milímetro cúbico de sangre. El sistema de medida era el siguiente:

a) Se asignaba a la abertura Pletora (sin vidrios azules) un valor de 5.625.000 glóbulos rojos por milímetro cúbico de sangre.

b) Las otras aberturas proporcionaban lecturas promedio, obtenidas al restar a la riqueza de Pletora la cantidad obtenida al multiplicar 125.000 por el número de vidrios fijado a cada abertura, de acuerdo con la siguiente tabla:

| Nombre de la abertura | Número de vidrios | Glóbulos rojos / mm ³ de sangre |
|-----------------------|-------------------|--|
| Plétora | 0 | 5.625.000 |
| Medía del hombre | 4 | 5.125.000 |
| Medía de la mujer | 9 | 4.500.000 |
| Anemia ligera | 14 | 3.875.000 |
| Anemia | 20 | 3.125.000 |

c) Se prueba con cada posición, de menor a mayor cantidad de vidrios, si es visible la llama de una candela situada a 1 metro del observador hasta llegar a la situación en la que la llama no es visible; en ese momento se toma como lectura la que corresponde a la posición inmediatamente anterior.

Así pues, se trataba de un utensilio de fácil manejo y lectura rápida (no se tardaba más de cinco minutos en preparar la disolución y realizar la medida correspondiente) de gran utilidad para el médico de cabecera, si bien los valores obtenidos se hallaban condicionados por el valor de partida y por la falta de precisión inherente a un valor medio.

El aparato, no obstante, podía ser empleado también como instrumento de precisión si la ocasión lo requería: para ello se analizaba una sangre determinada y se establecía su riqueza en glóbulos rojos; a continuación se ajustaba la pared móvil del recipiente para que un determinado espesor de capa líquida fuera opaco al emplear el orificio Pletora (sin vidrio); seguidamente, se acoplaba a este orificio un tubo especial, que Mantegazza denominaba *científico*, el cual podía sustentar una cantidad variable, entre 1 y 40, de vidrios azules. Dicho complemento se destinaba, por lo general, a determinaciones en sangres consideradas como «Anemia grave», donde la determinación de la riqueza en glóbulos rojos requería una mayor precisión.

No hubo posteriores intentos de relacionar opacidad y riqueza de una sangre hasta veinte años después, cuando Albert William Hénocque presentó en 1886 su hematoscopio, diseño que guarda una gran semejanza con el del lactoscopio de Rheineck, según se ha puesto de manifiesto recientemente (Garrigós *et al.*, 2006: 289-280). Estas iniciativas acabaron cuajando con el desarrollo de los métodos nefelométricos y turbidométricos, los cuales escapan a los objetivos de la presente comunicación.

Espectroscopia, colorimetría y análisis hematológico

El interés por aplicar la espectroscopia de absorción al análisis hematológico comienza prácticamente desde el mismo momento en que se publican las experiencias de Bunsen y Kirchoff; así, a principios de la década de 1860 Wilhem Preyer tuvo la idea de aplicar el análisis espectral a la determinación de la hemoglobina en sangre, ya que al diluir con agua una solución concentrada de sangre —o de hemoglobina— llega un momento en que su espectro, que inicialmente presenta sólo dos bandas de absorción entre las líneas D y E, manifiesta una coloración verdosa de separación entre dichas bandas (Malassez, 1877a: 9-10). El momento en que aparecía dicha zona verdosa era tomado como el punto de referencia para poder comparar dos soluciones: una de concentración de hemoglobina conocida, patrón; y otra problema, cuya concentración en hemoglobina era desconocida. El análisis espectral cuantitativo de la hemoglobina en sangre⁴ tuvo un desarrollo centrado en la cuestión de la precisión de las medidas y paralelo al de los métodos colorimétricos; concretamente, cabe citar la tesis doctoral de Edouard Branly (1882) y los trabajos de Maurice de Thierry (1885a, 1885b, 1885c, 1886, 1895), quienes llegaron a diseñar montajes espectroscópicos específicos para estos fines. También Hénocque (1886: 818-819) propone el empleo de su hematoscopio coadyuvado con el uso de espectroscopios específicos. Obviamente, este instrumental tampoco es objeto de esta comunicación.

Los métodos colorimétricos de análisis cuantitativos de hemoglobina en sangre comienzan con el procedimiento propuesto por Hermann Welcker, quien en 1854 recurrió a la comparación de una muestra de sangre de concentración desconocida en hemoglobina con una escala de disoluciones líquidas de concentraciones conocidas. Este mismo autor propuso una variante del método inicial consistente en utilizar no patrones líquidos, sino sólidos. Dichos patrones los obtenía mediante manchas de sangre desecadas en papel blanco; en este caso, la muestra problema debía ser observada sobre una pantalla del mismo papel (Malassez, 1877a: 11-14).

En 1858, Felix Hoppe propuso comparar una solución de hemoglobina, cuya concentración era conocida, con la sangre a analizar, la cual se iba diluyendo con una solución sódica

4. La aplicación del análisis espectral cuantitativo a la fisiología es tratado de manera genérica por vez primera por Karl Vierordt, en 1876, en su obra *Die quantitative Spectralanalyse in ihrer Anwendung auf Physiologie, Physik, Chemie und Technologie*. Este autor ya se había interesado por la cuantificación de los procesos de absorción de la luz mediante el empleo de espectroscopios (Vierordt, 1870).

en agua hasta lograr la equiparación de la coloración de los líquidos contenidos en dos tubos especiales denominados *hematinómetros*. El procedimiento era el siguiente: se introducen volúmenes idénticos (10 cc) de sangre defibrinada y diluida a una veintésima parte de su volumen inicial en una solución sódica y de una solución patrón de hemoglobina⁵ en sendos tubos de vidrio de caras planoparalelas separadas entre sí 1 centímetro,⁶ posteriormente se va añadiendo agua destilada a la sangre poco a poco, agitando tras cada adición, hasta lograr la misma coloración en ambos tubos. Según Malassez (1877a: 6-8), un sencillo cálculo posterior posibilitaba la determinación de la concentración de la disolución problema:⁷

Soient: **n** [sic, debería decir **x**] la quantité inconnue de hémoglobine que possède le sang analysé par chaque unité de volume, **s** le volume du sang employé, **e** celui de l'eau ajoutée, **h** la richesse en hémoglobine de la solution titrée.

La richesse de la solution sanguine est égale á la quantité d'hémoglobine, $s \cdot x$, divisée par la masse du liquide, **s+e**; or, cette richesse est égale à **h**; on a donc:

$$h = \frac{s \cdot x}{s + e}; \quad \text{d'où:} \quad x = \frac{(s+e) \cdot h}{s}$$

Un procedimiento idéntico, aunque inverso, al de Hoppe-Seyler es el propuesto por el danés Jacob Worm Müller, quien hacia 1875 sugiere comparar dos disoluciones: una, cuya concentración en hemoglobina es desconocida, con otra, integrada por agua destilada a la que paulatinamente se le van añadiendo cantidades conocidas de una solución patrón de hemoglobina en agua (Malassez, 1877a: 10-11).

El procedimiento de Welcker inspiró, sin lugar a dudas, el método propuesto por Hayem (1877: 947-950) hacia 1875 (Malassez, 1877a: 14) y ya descrito en la bibliografía (Garrigós *et al.*, 2006: 289-280). La diferencia entre ambas propuestas estriba en que el procedimiento de Hayem emplea dos recipientes de cristal de fondo plano y compara una muestra de sangre problema situada sobre una hoja de papel blanco y una muestra de agua destilada que desliza sobre un mapa de manchas de tintes impresos sobre papel blanco de la misma naturaleza.⁸

5. La dificultad de mantener estable en el tiempo una disolución de hemoglobina llevó a Hoppe-Seyler a proponer como solución patrón una solución valorada de hematina, obtenida según el procedimiento de Wittich, en una solución sódica.

6. Según Mantegazza (1865: 40), estos tubos de comparación, construidos por la casa Franz Schmidt de Berlín, fueron, posiblemente, idea del cuñado de Hoppe, el Dr. Seyler, quien actuó como su padre adoptivo. Hoppe, en reconocimiento, modificó su apellido adoptando la forma Hoppe-Seyler a la muerte de su benefactor (Verso, 1971: 60).

7. El procedimiento y el cálculo descritos por Malassez respecto del método de Hoppe-Seyler son exactamente los mismos que propuso en 1826 François Joseph Houtou de Labillardière para la determinación de la riqueza de índigo en índigos comerciales (Garrigós Oltra & Millán Verdú & Blanes Nadal, 2006: 94-100), si bien cabe reseñar la mejor calidad y diseño de los tubos empleados en el proceso de medida respecto del colorímetro de Labillardière.

8. Este procedimiento será el que utilice Joseph Salleron en su «vino-colorímetro» presentado tan sólo un par de años después (Garrigós *et al.*, 2006: 244-249).

Irrupción de los colorímetros de cuña. Colorímetro de Malassez

En alguno de los tratados sobre colorimetría que aparecieron en el primer cuarto del siglo xx (Snell, 1921; Snell & Snell, 1936-1937) se describen, como un grupo diferenciado, los denominados *colorímetros de cuña*, instrumentos de balance introducidos en el último cuarto del siglo xix en los que el recorrido óptico se varía mediante el empleo de un recipiente en forma de cuña, pudiendo variar la posición del recipiente «de cuña» respecto del ocular (Leeds, 1878; Crookes, *et. al.*, 1881); o bien el ocular respecto la posición del recipiente «de cuña» (Gallemkamp, 1891).

No obstante, y a pesar de estas reseñas, parece ser que el primer colorímetro «de cuña» fue diseñado por Louis Malassez, quien en 1877 dio a conocer un aparato destinado a determinar la riqueza de hemoglobina en sangre en una memoria publicada en *Archives de Physiologie Normale et Pathologique*; en dicho texto, sin embargo, el propio Malassez reconoce que concibió su procedimiento hacia finales de 1872 y ensayó su primer prototipo en el verano de 1873, aclarando las razones de su tardanza en presentarlo en público:

Si j'ai tardé si longtemps à faire connaître publiquement mon colorimètre, c'est que j'ai beaucoup tâtonné, beaucoup expérimenté avant d'en arrêter le type définitif; c'est que j'ai voulu en assurer la fabrication industrielle et me rendre un compte exact de son degré de précision.

De acuerdo con la descripción del autor (Malassez, 1877a: 19-24), el instrumento, que se representa en la figura 2, estaba constituido por una base plana rectangular de madera de 36 cm de base por unos 20 cm de altura. Dicha pantalla presentaba en su centro dos orificios circulares de 5 mm de diámetro, situados en una misma línea horizontal muy próximos uno de otro.

La base plana estaba concebida como un conjunto de piezas móviles que constituían el desarrollo de un paralelepípedo, de manera que todo el conjunto podía plegarse y constituir una caja de 20 × 10 × 3 cm, fácilmente transportable. Un obturador, ubicado delante de los orificios, permitía cerrar completamente el conjunto.

Detrás de uno de los orificios —en la figura, el de la derecha— se colocaba el depósito de un «mélangeur Potain»,⁹ si bien en este caso dicho depósito era de un diseño especial ya que, en lugar de ser esférico u ovoide, era de tipo prismático con dos caras planoparalelas separadas una distancia fija de 5 mm; por lo que al utilizar una pipeta para cada muestra, el espesor observado en cada una de ellas era siempre de 5 mm, y si las disoluciones de sangre en agua se realizan siempre con la misma concentración, las diferencias de coloración observadas entre ellas serán debidas exclusivamente al poder colorante de la sangre empleada.

9. El «mélangeur Potain» es una pipeta de dilución diseñada por Pierre Potain para el recuento de glóbulos rojos mediante procesos de dilución de la sangre.

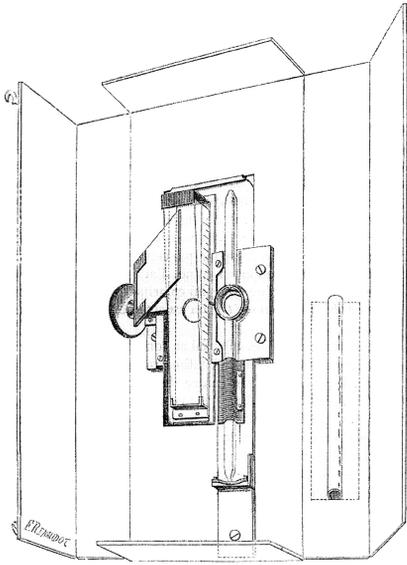


Figura 2a. Colorímetro de Malassez (1877).

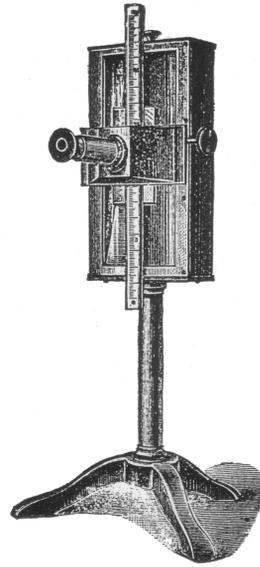


Figura 2b. Colorímetro de Gallenkamp (1891).

La pipeta de observación («mélangeur») se sujeta verticalmente pegada a la pantalla por medio de un anillo elástico a través del cual pasa su parte estrecha. El extremo inferior de la pipeta se halla obturado por medio de una lámina de caucho.

Detrás del segundo orificio (el de la izquierda en nuestra figura) se ubica una cubeta rec-topiramidal con una abertura de 10° , una altura de 75 mm y una anchura de base de 6 mm (dimensiones interiores). En dicha cubeta se introduce una disolución de picrocarminato de amónico,¹⁰ sustancia que presenta un espectro extremadamente similar al de la hemoglobina, y cuyas disoluciones son poco alterables con el tiempo (Malassez, 1877b).

Ante la inevitable pregunta de si era correcto comparar el color de un recorrido limitado por dos caras paralelas con el limitado por dos caras en forma de cuña, Malassez afirma:

Il est inutile de placer un second prisme en sens inverse du premier dans le but de produire une couche colorée partout d'égale épaisseur; dans mes appareils le trou de l'écran ets si petit, l'angle du prisme si aigu que les variations de coloration sont insignifiantes.

Esta cuña se ubica sobre un carrito que puede ser desplazado verticalmente con la ayuda de un sistema de rosca y cremallera; esta libertad de movimiento permite lograr la equipa-

10. El picrocarminato amónico era un reactivo empleado en tinciones celulares e integrado por una mezcla de ácido pírico, carmín y amoniaco (Editorial, 2003: 454).

ración del color de las dos muestras observadas. Una escala graduada se halla pegada sobre uno de los lados de la cuña, mientras que una aguja situada en la mitad de la línea que une los centros de los dos orificios permite leer sobre la escala la posición del prisma, o lo que es lo mismo, la concentración de la solución problema respecto de la disolución patrón (Garrigós *et al.*, 2006: 172).

El observador se sitúa en la parte posterior de la pantalla que sustenta todo el entramado instrumental observando los dos agujeros practicados en ella. Por detrás del recipiente de cuña y de la pipeta se coloca una lámina de vidrio esmerilado con la intención de difundir y «homogeneizar» la luz que debe atravesar ambas muestras; dicha lámina de vidrio se halla sujeta a la pantalla por una pestaña metálica dotada de una bisagra, lo que permite separarla de las cubetas de muestras cuando se trata de maniobrar con ellas.

¿Invención o innovación?; ¿«Mediating machines» o creación múltiple?

Una comparación, incluso superficial, entre los instrumentos de Malassez y Gallenkamp (véase la figura 2) permite evidenciar la gran similitud existente entre ellos, ya que la única diferencia a constatar es que mientras en el instrumento de Malassez se desliza la cubeta «de cuña», permaneciendo fijo el ocular (posición del observador), en el de Gallenkamp se desliza el ocular permaneciendo fijas las posiciones de ambas cubetas de muestras.

Por otra parte, la introducción de un prisma de reflexión total en el instrumento de Gallenkamp significa una mejora ergonómica respecto del instrumento de Malassez. No obstante, aún siendo importantes y significativas las innovaciones introducidas por la Gallenkamp and Company en su colorímetro, lo cierto es que la idea central alrededor de la cual se estructura este diseño es la misma que la empleada por Malassez; y posteriormente por Leeds (1878) y por Crookes, Odling y Tidy (1881) en sus respectivos diseños. Resulta, pues, evidente que la Gallenkamp and Company comenzó a fabricar su propio instrumental partiendo de las necesidades del mercado y de los prototipos existentes, lo que nos lleva a una cuestión básica: ¿quién detentaría la paternidad del colorímetro «de cuña»?

Por lo general, los procesos de transferencia suelen ser procesos de adaptación en los que se transita de lo general a lo particular, tal y como se evidencia en casos como la transformación del polarímetro en sacarímetro o del espectroscopio en hemoespectroscopio. Sin embargo, en este caso nos hallaríamos en un proceso inverso: primero se diseñan los utensilios específicos (Malassez; Leeds; Crookes; Holding; Tidy) y, por último, se concreta todo en un instrumento de empleo genérico (Gallenkamp).

Por otra parte, las diferentes tentativas de establecer una relación entre el color de la sangre y su composición tuvieron algo que ver con otras experiencias anteriores o posteriores vinculadas a parcelas del quehacer técnico cotidiano, estableciéndose recorridos desde unas aplicaciones concretas a otras, proceso en el que la aplicación de llegada guardaba poca o nula relación con la de partida. Una comparación entre el esquema de empleo del hemo-cromatómetro de Hayem (1877) y el vinocolorímetro de Salleron (1878) evidencia las gran-

des similitudes conceptuales existentes entre ellos, y ello a pesar de la constatación de la evolución ergonómica de uno a otro diseño, y de la especificidad de las escalas de tintes empleadas (Garrigós *et al.*, 2006: 247-248, 252-253).

Por último, y no por ello menos interesante, conviene señalar la similitud entre los diseños del lactoscopio de Donné (1843) y del globulímetro de Mantegazza (1865), similitud descrita en este mismo trabajo, y del lactoscopio de Rheineck (1871) y el hematoscopio de Hénocque (1886); casos en los que, al igual que con los diseños de Salleron y de Hayem, se transita de una circunstancia particular (contenido en grasa de la leche, o coloración del vino) a otra (contenido en hemoglobina de la sangre) (Garrigós *et al.*, 2006: 284, 289-291), circunstancias que se repiten al comparar las experiencias de Hotou de Labillardière, destinadas a la determinación del poder colorante de los índigos y otras materias tintóreas comerciales (Garrigós *et al.*, 2006: 94-99), y las de Hoppe-Seyler (1858) destinadas a cuantificar la hemoglobina en sangre (Malassez, 1877a: 9-11); así como las de Hermann Welcker (1854), destinadas a este mismo fin (Malassez, 1877a: 11), y las de Lampadius (1838), Heine (1845), Herapath (1852) y Blodget-Britton (1870), destinadas a la determinación de iones metálicos en disoluciones acuosas (Garrigós Oltra & Millán Verdú & Blanes Nadal, 2006: 115-116).

Todo ello nos permite conjeturar que nos hallamos en una situación en la que no existe una dirección evolutiva clara, ya que todas las técnicas colorimétricas del siglo XIX (dilución, balance y diafanometría) participan en el diseño de utensilios y procedimientos tendentes a relacionar el color de la sangre y la riqueza en hemoglobina; por ello, más bien podría identificarse una base conceptual común caracterizada por dos ideas fuerza:

- a) la intensidad de color que presenta un determinada muestra líquida transparente depende de la cantidad de materia colorante contenida en ella;
- b) la percepción que se tiene de que la intensidad de color de una disolución coloreada y transparente depende del espesor de la capa líquida observada.

Estas ideas, con el tiempo, acabarán formalizándose en la Ley de Lambert-Beer.

A dicha base conceptual se le yuxtaponen algunos conceptos de nuevo corte, como las ideas de Von Helmholtz sobre los colores, o más concretamente sobre la mezclas sustractivas (empleo de filtros de colores complementarios para lograr sensación de opacidad), empleadas por Mantegazza en el diseño de su globulímetro.

Llegados a este punto, resulta en extremo difícil aventurar la paternidad de un determinado diseño, máxime si se tiene en cuenta el papel jugado por las empresas constructoras de instrumental científico que, en muchos casos, construían prototipos por encargo, los cuales, posteriormente, comercializaban con autorización de los propios diseñadores, por lo que no queda claro el papel de la protección de la propiedad intelectual o industrial ya que, en tales casos, las empresas constructoras, sin detentar la paternidad del diseño, jugaban sus bazas exclusivamente en función de acabados, precio y precisión.

Bibliografía

- BRANLY, E. (1882), «Dosage de l'hémoglobine dans le sang par les procedes optiques», *Annales de Chimie et de Physique*, **27** (5º fascículo), 238-273.
- CHEVALLIER, A. (1854-1855), *Dictionnaire des alterations et falsifications des substances alimentaires*, Madrid, Imprenta Manuel Álvarez, 2 v. [Trad. Ramón Ruis Gómez]
- CROOKES, W.; HOLDING, W.; TIDY, C. M. (1881), «London Supply», *Chemical News*, **14**, (abril), 174.
- EDITORIAL (2003), «Orceína y fibras elásticas», *Medicina (Buenos Aires)*, **63**, (5/1), 453-456.
- GALLENKAMP, A. (1891), «Ein neues colorimeter», *Neue Zeitschrift für Rübenzucker-Industrie*, **27**, 220-223.
- GARRIGÓS-OLTRA, L.; MILLÁN-VERDÚ, C.; BLANES NADAL, G. (2006), *El color líquido. Instrumentos y útiles de la colorimetría en el siglo XIX*, Alicante, Aguaclara.
- HAYEM, G. (1877), «Du dosage de l'hémoglobine par le procede des teintes colorées», *Archives de Physiologie Normale et Pathologique*, **4** (2º fascículo), 946-970.
- HÉNOCQUE, A. W. (1886), «L'hématoscopie, méthode nouvelle d'analyse du sang, basée sur l'emploi du spectroscopie», *Comptes Rendus*, **103**, 817-820.
- LEEDS, A. R. (1878), «Colour-comparator for quantitative Analyses», *Chemical News*, **7** (junio), 229-230.
- MALASSEZ, L. (1877a), «Sur les diverses méthodes de dosage de l'hémoglobine et sur un nouveau colorimètre», *Archives de Physiologie Normale et Pathologique*, **4** (2º fascículo), 1-40.
- (1877b), «Note sur le spectre du picocarminate d'ammoniaque», *Archives de Physiologie Normale et Pathologique*, **4** (2º fascículo), 40-43.
- MANTEGAZZA, P. (1865), *Del globulimetro, nuovo strumento per determinare rapidamente la quantita del globetti rossi del sangue, et nuove ricerche ematologiche*, Milán, Tip. Giuseppe Chiusi.
- SNELL, F. D. (1921), *Colorimetric analysis*, Nueva York, Van Nostrand Company.
- SNELL, F. D.; SNELL, C. T. (1936-1937), *Colorimetric methods of analysis*, 2ª ed., Londres, Chapman Hall, 2 v.
- THIERRY, M. de (1885a), «Héma-spectroscope», *La Nature*, **13** (2), 170-171.
- (1885b), «Sur un nouvel appareil dit héma-spectroscope», *Comptes Rendus*, **100**, 1244-1246.
- (1885c), «Sur un nouveau spectroscopie d'absorption», *Comptes Rendus*, **101**, 811-813.
- (1886), «La recherche médico-légale du sang. Grand spectroscopie d'absorption», *La Nature*, **14** (2), 3-6.
- (1895), «Sur un nouvel appareil dit héma-spectroscope comparateur», *Comptes Rendus*, **120**, 775-777.
- VERSO, M. L. (1964), «The evolution of blood-counting techniques», *Med. Hist.*, **8**, 149-158.
- (1971), «Some nineteenth-century pioneers on hematology», *Med. Hist.*, **15**, 55-67.
- VIERORDT, K. (1870), «Die Messung der Lichtabsorption durchsichtiger Medien mittelst Spectralapparates», *Annalen der Physik und Chemie*, **140**, 172-175.
- (1876), *Die quantitative Spectralanalyse in ihrer Anwendung auf Physiologie, Physik, Chemie und Technologie*, Tübingen, H. Laupp.