

# Análise das ultradiluições: Explorando os efeitos da potencialização por meio de microscopia eletrônica, espectroscopia Raman e *deep learning*

Camelia Berghian-Grosan<sup>a</sup>, Sahin Isik<sup>b</sup>, Alin Sebastian Porav<sup>a</sup>, Ilknur Dag<sup>c,d</sup>, Kursad Osman Ay<sup>c</sup>, George Vithoukaskas<sup>e</sup>

a National Institute for Research and Development of Isotopic and Molecular Technologies, Cluj-Napoca 400293, Romênia

b Computer Engineering Department, Eskisehir Osmangazi University, Eskisehir 26480, Turquia

c Central Research Laboratory Application and Research Center, Eskisehir Osmangazi University, Eskisehir 26480, Turquia

d Vocational Health Services High School, Eskisehir Osmangazi University, Eskisehir 26480, Turquia

e University of the Aegean, Mitilene 81100, Grécia

Tradução para o português por Nathalia Henrique Ursino Lopes

## RESUMO

O tema das diluições ultra altas está em contínuo debate ao longo dos anos, principalmente porque as possibilidades de análise dessas soluções diluídas são limitadas. Neste contexto, investigações por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram conduzidas para avaliar as características morfológicas de soluções de ouro altamente diluídas em base de etanol e água; três níveis de potencialização (6C, 30C e 200C) foram analisadas para cada tipo de solução. Além disso, Espectroscopia Raman e algoritmos de *deep learning* (DL) foram empregados para a análise dos três níveis de potencialização de água purificada, água não purificada e soluções de ouro à base de água purificada. Foram avaliadas três remessas para cada categoria considerada, e a capacidade de distinguir entre todas as classes investigadas, as potências dentro de cada grupo ou entre as classes dentro do mesmo nível de potencialização foram apresentadas e discutidas em correlação com os achados por MET. Formas distintas de organização foram reveladas pela MET para os três níveis de potencialização, enquanto o modelo de unidade recorrente fechada (sigla em inglês GRU – *gated recurrent unit*) mostrou grande precisão (88%) para discriminação de todas as classes, mais de 90% de precisão para a distinção das amostras dentro de cada grupo, e mais de 95% de precisão na classificação dentro do mesmo nível de potencialização caso fosse utilizada espectroscopia Raman não pré-tratada. Desta forma, esse conjunto de métodos (MET-EDX e espectroscopia Raman, combinadas com DP) pode ser utilizado, com sucesso, para a caracterização e diferenciação de soluções altamente diluídas resultantes de potencializações. Ademais, considerando-se os resultados obtidos a partir do estudo de discriminação envolvendo as onze classes e a abordagem de aumento de dados, o método de segmentação espectral pode ser visto como uma estratégia valiosa para aumentar a exatidão de previsão do modelo.

**Palavras-chave:** Aurum metallicum, diluições ultra altas, potencialização, conjuntos de clusters, inteligência artificial, dados Raman.

## 1. Introdução

A potencialização é um processo que envolve diluições e succussões (agitação vigorosa) sucessivas; foi inicialmente apresentada pelo médico alemão Samuel Hahnemann, que observou que as soluções de substâncias submetidas a este processo têm um efeito biológico em humanos – com evidências terapêuticas [1]. Até hoje, diversos remédios homeopáticos foram utilizados e são muito bem documentados [2-6]. Eles são derivados de uma ampla variedade de substâncias que passam por potencialização para adquirir suas propriedades curativas. Várias perspectivas criteriosas tentaram explicar a ação dos remédios homeopáticos [7-11]. O impacto das succussões (agitação vigorosa) em algumas preparações farmacêuticas, como *Echinacea* 10<sup>-2</sup>, *Baptisia* 10<sup>-3</sup>, *Baptisia* 10<sup>-4</sup>, *Luffa* 10<sup>-4</sup>, e *Spongia* 10<sup>-6</sup>, foram recentemente evidenciadas com o auxílio de evaporação de gotículas e análise estatística; as amostras foram produzidas de acordo com as regras da Farmacopeia Europeia para medicamentos homeopáticos, e os autores empregaram 0, 10 ou 100 succussões. Os resultados mostraram diferenças significativas em todas as preparações analisadas [12]. Além disso, os efeitos de choques mecânicos (isto é, agitação, queda) nas soluções proteicas são bem conhecidos, e medidas para mitigar esses efeitos têm sido investigadas e propostas em alguns estudos [13-14]. No entanto, para a homeopatia, a agitação juntamente com a diluição são ferramentas essenciais para a preparação dos remédios.

Uma grande preocupação com relação às soluções potencializadas em altas diluições (30C, 200C, etc.) além do número de Avogadro, que estabelece o limite de diluições (12C) além do qual a substância original não pode estar presente, é que não se espera encontrar a matéria-prima nem

sequer nas menores quantidades [15]. Todavia, em um estudo baseado em medicamentos obtidos a partir de metais, Chikramane et al. [10] demonstrou a presença da matéria-prima, na forma de nanopartículas, em diluições extremas de 30C e 200C, através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), difração de elétrons e espectroscopia de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP-AES). Várias técnicas têm sido utilizadas ao longo dos anos para a caracterização dos remédios preparados homeopaticamente, salientando a existência de estruturas específicas mesmo em medicamentos altamente diluídos [16-24]. Contudo, dentro da comunidade científica, sabe-se que o experimento de Benveniste [25], logo após a divulgação de suas descobertas, foi comprovado como sendo falso por um comitê científico enviado pela revista *Nature* ao laboratório do autor, conforme explicado por George Vithoulkas em seu artigo “A controvérsia sobre a memória da água” [26].

A água é um importante solvente, que tem um importante papel nos processos químicos e biológicos [27]. Portanto, compreender as propriedades anômalas da água líquida é de interesse contínuo, e muitos estudos teóricos e experimentais têm sido realizados para entender sua estrutura [28, 29]. No entanto, a estrutura e a dinâmica da água ainda estão sob constante debate [30]. A sensibilidade do modo de estiramento OH a diferentes ambientes locais permite o uso da espectroscopia vibracional no estudo da estrutura e dinâmica da água líquida [28]. A análise da água líquida por meio de espectroscopia infravermelha e Raman revela amplos picos na região de estiramento OH, sugerindo múltiplas contribuições subjacentes (de várias espécies induzidas por diferentes arranjos locais das pontes de

hidrogênio), enquanto picos distintos podem ser claramente observados nos espectros do gelo [31]. Em 2009, Sun [32] analisou a água líquida sob condições ambientais, por espectroscopia Raman, e propôs a desconvolução da região de estiramento OH em cinco subgrupos. Porém, devido à complexidade da água e das altas diluições das soluções analisadas, essa investigação é uma tarefa difícil. Para sanar essas dificuldades, técnicas quimiométricas e, mais recentemente, modelos de *machine learning* (ML) têm sido aplicados aos sinais Raman para análise e *data learning* [33].

Atualmente, os algoritmos de ML estão ganhando popularidade nos aplicativos de classificação [34, 35]. Recentemente, métodos de algoritmos tradicionais e de *deep learning* foram exitosamente aplicados para discriminar o espectro Raman em diversos materiais complexos (como os minerais) ou para classificar dados espectroscópicos de alta dimensão [36-38].

*Deep learning* (DL) é um subcampo do ML que é substancialmente mais robusto que os métodos baseados em *feature engineering* usados no passado. As abordagens de DL têm muitos benefícios, incluindo economia de tempo, a não necessidade de construção de recursos e produção de resultados superiores. Redes neurais artificiais, amiúde conhecidas como ANNs, são as precursoras das técnicas de DL. As ANNs consistem em uma camada de inserção, um ou mais níveis intermediários (camadas), e uma camada de saída. Essas abordagens são frequentemente treinadas por aprendizagem supervisionada, o que significa que identificações predefinidas são utilizadas para um conjunto de dados no processo de treinamento. A rede neural convolucional (CNN, em inglês) [39], uma das redes de DL mais representativas, é um tipo de rede neural de feedback direto que usa operações convolucionais e um

grande número de filtros. Há muitos tipos diferentes de algoritmos de aprendizado de base convolucional que podem ser usados de acordo com a tarefa desejada. Tipicamente, modelos de CNN 2D são utilizados para aplicações baseadas em imagens. Modelos de unidade recorrente fechada (GRU) [40,41] e de CNN 1D são usados para operar tarefas de previsão ou classificação baseadas em séries temporais. A principal motivação é que os modelos recorrentes têm a capacidade potencial de preservar relações de longo prazo entre os dados sequenciados. Essas abordagens fornecem uma ajuda substancial na solução do problema do desaparecimento do gradiente [42].

O presente trabalho investiga a organização estrutural de soluções potencializadas de ouro em base de etanol e água, um remédio homeopático denominado Aurum metallicum (AUR). Três soluções de AUR altamente diluídas (6C, 30C e 200C) foram submetidas à análise por MET, por dois laboratórios independentes, localizados na Romênia e na Turquia. Diferentes organizações dessas soluções foram confirmadas por ambos os laboratórios. A escolha dessas diluições centesimais foi motivada pela necessidade de investigar soluções contendo baixas quantidades da substância inicial, mesmo além do número de Avogadro (ou seja, as duas últimas diluições investigadas). Espectros Raman também foram obtidos de diversas soluções potencializadas, à base de água (água purificada (PW), água não purificada (UW) e solução de ouro em base de água purificada (AUR)), e processados por algoritmos de DL para investigar a capacidade dos modelos GRU de discriminar entre todas essas soluções e classificar as amostras dentro das categorias investigadas (AUR, PW e UW) ou dentro dos três níveis de potencialização (6C, 30C e 200C). Foi utilizado DL para avaliar sua

eficácia na classificação dos espectros Raman. Os valores espectrais Raman são considerados valores de séries temporais, portanto, aplicamos uma rede neural recorrente. Realizamos experimentos com o modelo de GRU, uma vez que ele resolve tanto o problema de desaparecimento do gradiente, quanto a questão da velocidade. Assim, testamos a capacidade dessa abordagem de classificação para ser utilizada, combinada à espectroscopia Raman, para análise de soluções à base de água obtidas após a potencialização. Nossos resultados nos permitiram comprovar que esse conjunto de métodos (MET-EDX e espectroscopia Raman, combinadas com DP) pode ser utilizado, com sucesso, para a caracterização e diferenciação de soluções altamente diluídas resultantes de potencializações.

## 2. Materiais e método

Todas as soluções investigadas foram preparadas pela empresa Korres (Atenas, Grécia), uma empresa certificada pela *National Medicines Agency* [Agência Nacional de Medicamentos] (EOF – Grécia). Essas soluções foram produzidas de acordo com a Farmacopeia Homeopática Alemã (GHP, em inglês), em adesão às diretrizes para Boas Práticas de Manufatura [*Good Manufacturing Practice*] (GMP) [43], e levando em consideração os procedimentos da Farmacopeia Europeia para testes de conformidade, com algumas poucas exceções claramente indicadas. Especificamente, as exceções dizem respeito aos solventes usados na etapa final do processo de preparação: etanol 50% v/v para soluções à base de etanol, e água purificada para soluções à base de água. As soluções foram categorizadas em três grupos, com base na matéria-prima: água purificada (PW), água não purificada (UW) e Aurum metallicum (AUR). Para cada categoria, três níveis de potência foram preparados (6C, 30C e 200C), com três lotes

de cada nível de potência produzido em dias diferentes. O registro C está associado à diluição centesimal, e significa uma parte da solução concentrada/previamente potencializada, em 99 partes de eluente (massa/massa).

Para amostras de PW e UW, o objetivo foi preparar soluções potencializadas análogas em todos os aspectos às soluções medicamentosas, exceto pela ausência de um ingrediente medicinal ativo. A PW (em conformidade com a Farmacopeia Europeia – Ph. Eur.) é geralmente utilizada na preparação dos remédios homeopáticos, enquanto a UW era parcialmente purificada. Os tipos de água empregados neste estudo tinham as seguintes características, como indicado pela empresa Korres: PW – condutividade 0.7–0.88  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , pH 6.4–6.8,  $\text{NO}_3^- < 0.2$  ppm, e íons metais, Al < 3–5 ppb, As < 0.005 ppm, Pb 0.00032 ppm, Cd < 0.001 ppm, Hg < 0.0005 ppm (total de metais pesados 0.00682 ppm, limite < 0.1 ppm); UW – condutividade 196  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , pH 7.8,  $\text{HCO}_3^-$  66 ppm,  $\text{Cl}^-$  22 ppm,  $\text{NO}_3^-$  9.8 ppm,  $\text{Na}^+$  15 ppm,  $\text{Ca}^{2+}$  10 ppm,  $\text{Mg}^{2+}$  8.8 ppm,  $\text{CO}_2$  9.7 ppm. Desta forma, água purificada e não purificada da Ph. Eur., respectivamente, foram utilizadas como matéria-prima. A água purificada da Ph. Eur. também foi empregada no processo de diluição e, devido a propósitos experimentais específicos, na preparação das soluções de PW e UW da 30C e 200C.

Para a categoria AUR, o método baseado na trituração de Aurum metallicum, com lactose monohidratada como veículo, foi primeiramente levado até o nível 4C; depois, para se obter a potência líquida de 6C, o protocolo empregou água purificada (em conformidade com a Ph. Eur.) para a preparação da potência 5C e etanol 30% (m/m) para a produção da diluição 6C. Começando da 6C até a 29C, e da mesma forma até a 199C, utilizou-se a água

purificada da Ph. Eur. no processo de preparação. As soluções potencializadas finais de 30C e 200C foram produzidas com etanol 50% (v/v) para as soluções de AUR à base de etanol. Por propósitos experimentais específicos, a água purificada da Ph. Eur. foi utilizada no processo de preparação das soluções 30C e 200C de AUR à base de água.

#### *2.1.1 Microscopia eletrônica de Transmissão*

Para os estudos de MET, dois tipos de amostras de AUR foram incluídas; o primeiro tipo, AUR preparado em solução de etanol 50% v/v, foi analisado na Romênia e indicado como E-AUR, enquanto o segundo tipo de AUR foi preparado somente com água purificada (PW) e foi submetido à análise na Turquia (indicado como W-AUR). Para os dois tipos de AUR, três amostras potencializadas foram investigadas, a saber, 6C, 30C e 200C.

#### *2.1.2 Investigações Raman*

Para as investigações Raman, três tipos de soluções foram utilizadas: água purificada (PW), água não purificada (UW) e AUR. Além disso, para os grupos PW e UW, nós consideramos amostras não potencializadas (amostras de referência dos tipos de água usados no processo de potencialização) e três tipos de amostras de água potencializada (6C, 30C e 200C); para cada tipo de amostra de água potencializada, três lotes foram preparados em três dias diferentes. Para a categoria AUR, somente as soluções à base de água potencializada foram investigadas. Isto significa que foram consideradas um total de 12 amostras de PW, 12 amostras de UW, e 9 amostras de AUR.

### *2.2 Método*

#### *2.2.1 MET e procedimentos EDX romenos*

A caracterização estrutural e morfológica das amostras de AUR foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura e

transmissão Hitachi HD-2700 (sigla em inglês, STEM) equipado com um detector de elétrons secundário (SE), um detector de elétrons transmitidos (TE) (Hitachi High Tech., Japão) e uma pistola de emissão de campo frio projetada para imagens de alta resolução (HRTEM) com resolução de 0,144 nm. Grades de MET revestidas com carbono foram tratadas com 6 µl das soluções potencializadas de AUR, que foram previamente sucussadas 10 vezes para homogeneização. Após 1 a 2 minutos, o excesso de líquido foi enxugado com papel de filtro Whatman grau 1 e as grades foram deixadas secar ao ar. As amostras foram analisadas utilizando-se o sistema STEM operado a 200 kV. Um sistema EDX duplo composto de um detector de desvio de silício (SDD) X-Max N100TLE (*Oxford Instruments*) foi usado para as investigações EDX.

#### *2.2.2 MET e procedimentos EDX turcos*

Imagens de MET das três potências (6C, 30C e 200C) de AUR foram obtidas utilizando-se um MET Hitachi HT 7800, operando a uma voltagem de aceleração de 100KV. Depois de cada amostra ter sido agitada 10 vezes, uma gota foi colocada em uma grade revestida de carbono e deixada para secar em ambiente limpo. A análise EDX das amostras foi realizada utilizando-se um *Oxford Instruments X-MaxN* conectado ao mesmo dispositivo MET para confirmar a presença de ouro.

Os histogramas preparados para as imagens de MET romenas e turcas foram realizados com base nos dados obtidos pelo software ImageJ (NIH, EUA).

#### *2.2.3 Espectroscopia Raman*

Os espectros Raman foram registrados em um espectrômetro Raman NRS-3300 (Jasco, Japão), equipado com um detector de dispositivo de carga acoplada (CCD) usando

excitação a laser de 514,5 nm (luz verde). As soluções foram analisadas em tubos capilares de vidro (Marienfeld, Alemanha) com um diâmetro de 1,5-1,6 mm. Uma objetiva Olympus UMPLFL 20X, uma grade de 600 l/mm, corte de 0,1 × 6 mm, tempo de exposição de 120s e três varreduras foram empregadas para registrar os espectros Raman de aproximadamente 72 cm<sup>-1</sup> a 4020 cm<sup>-1</sup>. O pico de 521 cm<sup>-1</sup>, correspondente ao Si, foi usado para calibrar o espectrômetro. Os dados brutos e com ruído não foram eliminados ou suavizados, e os valores discrepantes não foram removidos do conjunto de dados. O pré-processamento dos dados envolveu duas etapas principais e foi realizado com Spectra Manager (JASCO) e OriginPro 2023 (OriginLab Corporation). A primeira etapa de pré-tratamento de dados selecionou um intervalo de número de onda de 180 a 4.000 cm<sup>-1</sup> e limitou o número de recursos abaixo de 13.000, aplicando um método spline de 3ª ordem com um espaçamento de dados de 0,3. Esses dados foram normalizados para [0,1] e considerados para investigação com DL como dados Raman não pré-tratados. A segunda etapa envolveu um processo de subtração da base de dados (bg) que foi aplicado no OriginPro aos dados obtidos, antes da normalização, na primeira etapa. Para aplicar o processo BG, foram executadas as seguintes etapas: modo de base de dados definido pelo usuário, método de 2ª derivada (zeros) para detecção de ponto de ancoragem, ajuste ao espectro, método de interpolação de linha e o mesmo número de pontos da base de dados como dados de entrada [44]. Os dados obtidos foram normalizados para [0,1] antes de serem usados na construção dos conjuntos de dados pré-tratados com bg para o estudo com DL.

#### 2.2.4 Deep learning

As investigações de DL foram realizadas utilizando as linguagens de programação

Python e ColabPro, que fornecem um ambiente de computação acelerado. O modelo GRU foi construído e treinado utilizando a biblioteca Keras 2.12.0. A GPU Colab Tesla T4 foi utilizada para treinar o modelo com tamanho de remessa grande. O Tesla T4 tem um total de 2.560 núcleos CUDA, além de computar 3,7, 15 GB de memória e VRAM GDDR6. Além disso, o pacote Sklearn 1.2.2 foi utilizado para analisar e explicar os resultados obtidos. Mais detalhes a respeito do protocolo de investigações com DL estão apresentados no arquivo de Material Suplementar e nas figuras S1 e S2.

### 3. Resultados

Para determinar a capacidade do nosso método proposto de caracterizar as diversas soluções e potências, a princípio visamos determinar as propriedades das amostras através da análise por MET.

#### 3.1 Investigação por MET

A MET é uma valiosa ferramenta que fornece dados fundamentais sobre a organização dos nanomateriais; este conhecimento é muito importante para a compreensão e o desenvolvimento na ciência dos materiais, assim como para as áreas que utilizam soluções altamente diluídas, que também são compostas por nanoestruturas.

##### 3.1.1 Aurum metallicum 6C

A Figura 1 apresenta várias imagens de MET obtidas por dois instrumentos distintos (veja a seção Método) para a potência 6C de AUR. Foram empregados dois diferentes meios para a preparação das amostras – o primeiro foi uma solução de etanol 50% v/v, que foi usado para amostras de AUR analisadas na Romênia (E-AUR 6C). O segundo meio foi água purificada, empregada nas amostras analisadas na Turquia (W-AUR 6C).

Apesar das diferenças subjacentes nos solventes, as imagens obtidas por MET são bastante similares no que diz respeito à forma das nanopartículas. No entanto, o tamanho da nanopartícula depende do tipo de solvente. Isso é revelado nos histogramas das duas amostras, indicando partículas menores em E-AUR 6C do que em W-AUR 6C (Fig. 1C e G), provavelmente porque o etanol é mais efetivo do que a água como agente estabilizador. Os dados EDX (inserções da Fig. 1 e Figuras S3 e S4) mostram porcentagens comparáveis de ouro (Au) em ambas as amostras, e a presença de silício (Si) e oxigênio (O) (o cobre (Cu)) é proveniente da grade).

### 3.1.2 *Aurum metallicum 30C*

Ademais, foi investigado a potência de AUR 30C; As Figuras 2 e S5-S8 mostram as imagens de MET, dados EDX e resultados de mapeamento MET-EDX para essa potência. Vale mencionar as semelhanças entre as duas amostras, E-AUR 30C e W-AUR 30C, em termos da forma das nanopartículas e o surgimento de impurezas.

Como no caso anterior, da potência 6C, o tamanho das nanopartículas/nanoestruturas da potência 30C tendem a ser menores para E-AUR do que para W-AUR (Fig. 2C e G); este comportamento é explicado pela capacidade do etanol de agir como eficiente agente estabilizador. Além disso, os histogramas nas Figuras 1 e 2 indicam nanoestruturas menores em E-AUR 30C que E-AUR 6C, e uma significativa diminuição de tamanho, de mais de 150nm, em relação às amostras à base de água; essas grandes estruturas são

claramente observadas em W-AUR 6C, mas são visíveis apenas vestígios na amostra W-AUR 30C. Essa relevante mudança entre os perfis das duas potências, 6C e 30C, surgem após o processo de potencialização, que envolve diversas diluições e sucussões sucessivas.

### 3.1.3 *Aurum metallicum 200C*

As características da potência 200C estão ilustradas nas Figuras 3 e S9-S11, e foram obtidas pela análise das duas amostras (E-AUR 200C – preparada utilizando-se solução aquosa de etanol 50% v/v, e W-AUR 200 – obtida somente com água purificada).

A tendência geral observada para as potências 6C e 30C está presente aqui também; mais precisamente, o tamanho das nanoestruturas na amostra E-AUR 200C é menor que aquelas em W-AUR 200C, como revelado nos histogramas, na Fig.3. Além disso, em ambas as amostras 200C, as nanopartículas são maiores que as nanopartículas observadas na potência 30C e muito diferentes em formato e tamanho das nanopartículas da potência 6C (Figuras 1-3).

Organização distinta e total ausência de impurezas dentro de alguns conjuntos de clusters de AUR 200 estão evidentes na Fig. 3B. Ademais, as duas amostras de AUR 200 mostram modo preferencial de montagem ramificada (Figuras 3A e D), e a presença de pequenas quantidades de impurezas, como Si e Fe, nesses clusters, é demonstrada pelos dados EDX apresentados nas inserções das Figuras 3, S9 e S11B.

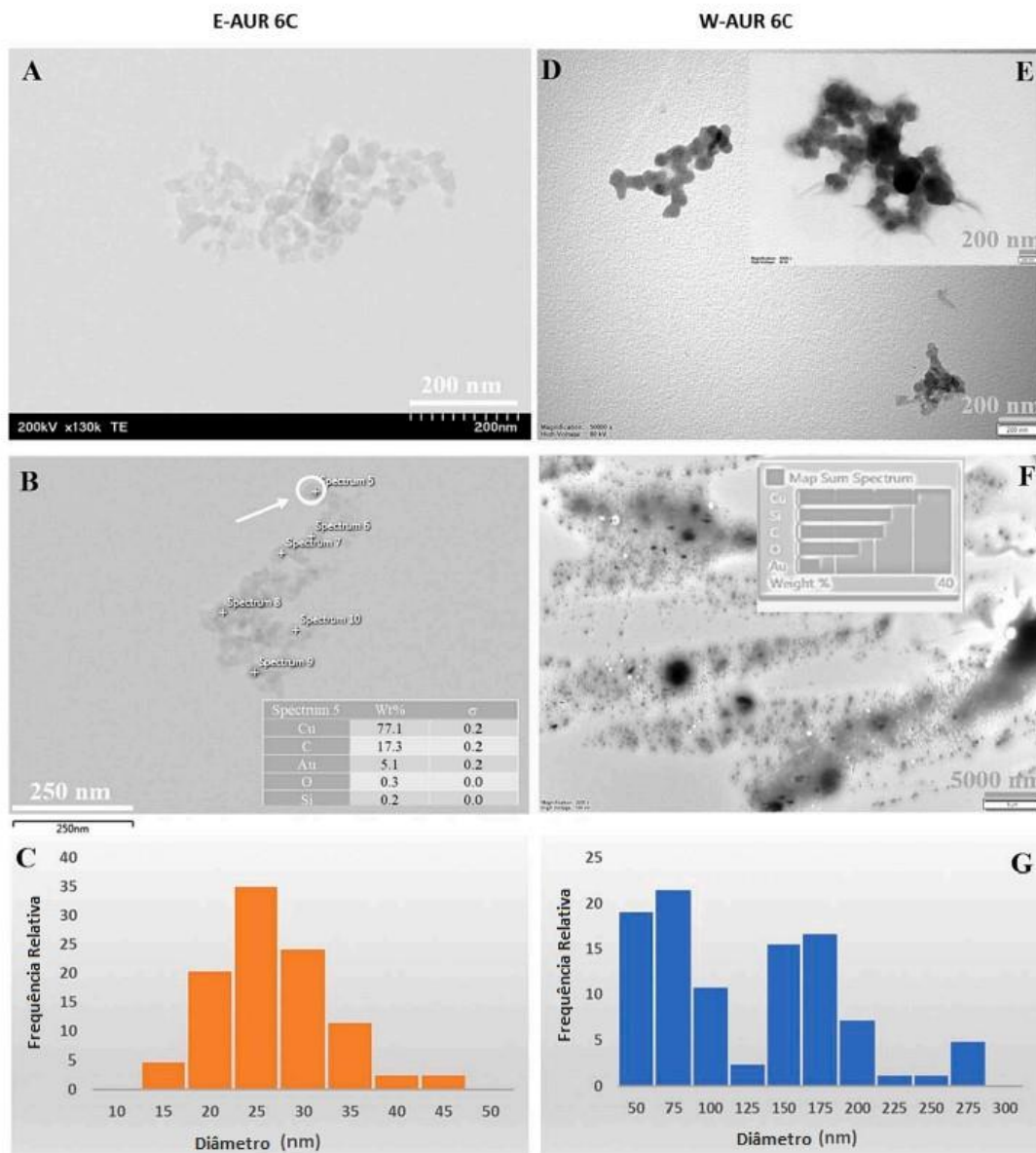


Figura 1. Dados de MET para a potência 6C de AUR. (A-C) Imagens de MET e histograma da frequência relativa dos tamanhos das nanopartículas para as amostras de AUR à base de etanol e (D-G) para as amostras à base de água; inserção – dados EDX para os pontos marcados ou o espectro de soma.

### 3.2 Investigações por espectroscopia Raman e deep learning

Após conduzir as investigações por MET, uma técnica rápida e não-destrutiva, como a espectroscopia Raman, pode ser considerada para análise das soluções estudadas. Devido aos maiores conjuntos observados na MET para as amostras à base de água, e considerando as peculiaridades Raman das soluções de água e etanol, a espectroscopia Raman foi aplicada apenas às soluções à base de água. O objetivo foi investigar as

transformações que surgem nos três grupos/categorias: PW, UW e AUR. No geral, a PW é utilizada na preparação dos remédios homeopáticos, enquanto a UW é uma forma parcialmente purificada de água; esses tipos de água possuem características diferentes. Aqui, percebemos a baixa condutividade das amostras de PW (0.7–0.88  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) e seus baixos níveis de íons ( $\text{NO}_3^- < 0.2$  ppm,  $\text{Al} < 3\text{--}5$  ppb, total de metais pesados 0.00682 ppm); além disso, as amostras de UW têm condutividade mais alta (196  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), bem como concentração mais elevada de íons



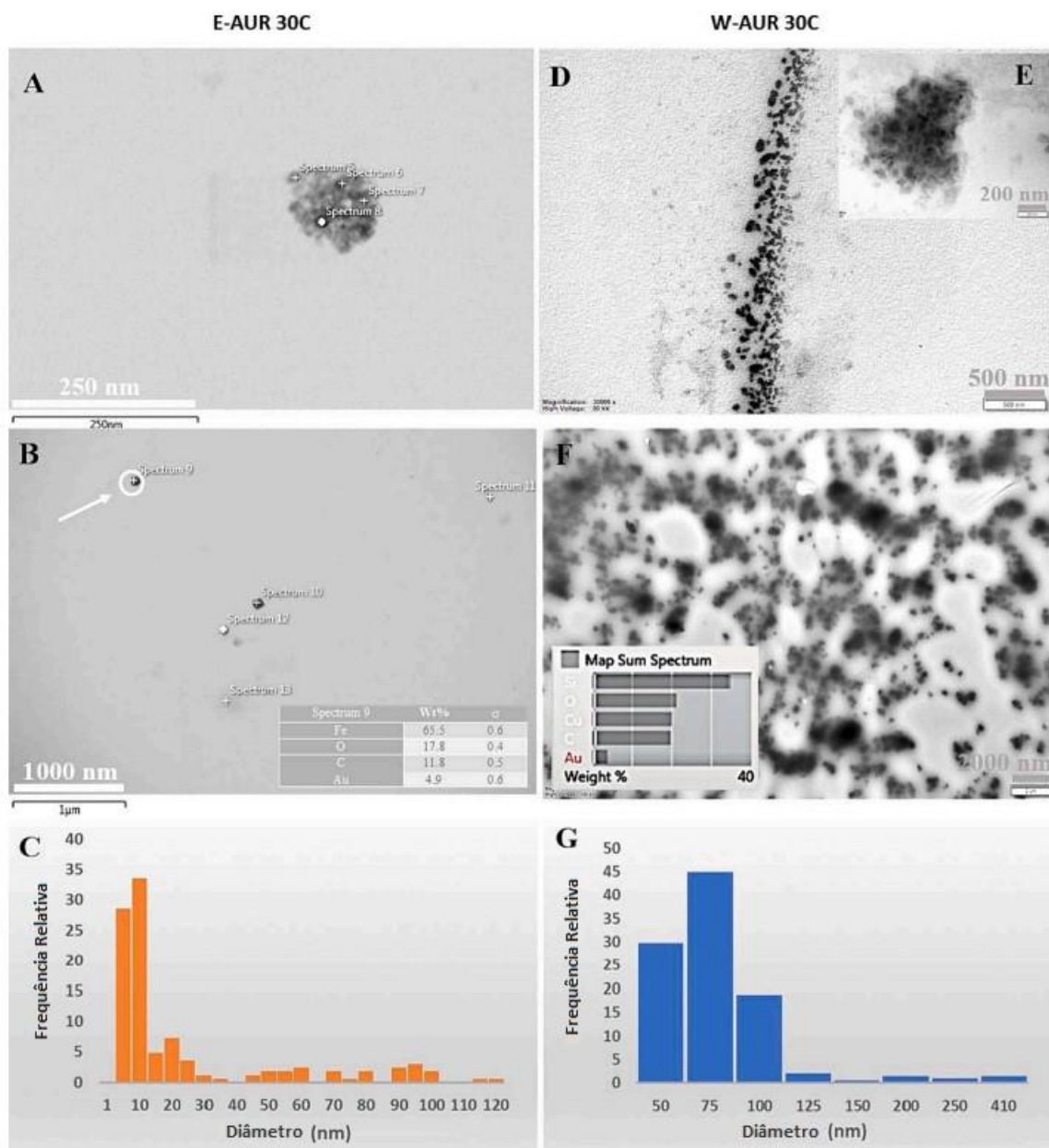


Figura 2. Dados de MET para a potência 30C de AUR. (A-C) Imagens de MET e histograma da frequência relativa dos tamanhos das nanopartículas para as amostras de AUR à base de etanol e (D-G) para as amostras à base de água; inserção – dados EDX para os pontos marcados ou o espectro de soma.

(nitrato, bicarbonato, sódio etc.). Veja a seção Materiais e Método para mais detalhes.

Foi aplicada a potencialização nas amostras de PW, UW e AUR preparadas em três dias distintos, para obter três lotes de amostras potencializadas nas potências 6C, 30C e 200C. Geralmente, PW e UW não são potencializadas para comercialização; o procedimento de potencialização foi aplicado a elas somente para este estudo. Assim, 33 amostras foram analisadas por

espectroscopia Raman. Cada amostra foi analisada em 5 pontos para se obter dados representativos das soluções investigadas. Um total de 165 espectros Raman (faixa 180–4000  $\text{cm}^{-1}$ ) foram submetidos ao estudo de classificação. Os espectros Raman brutos e pré-tratados por bg, obtidos durante este experimento, para os diferentes níveis de potencialização (6C, 30C e 200C) dos tipos de amostras analisados (AP, NP e AUR), são mostrados nas Figuras S12-S17.

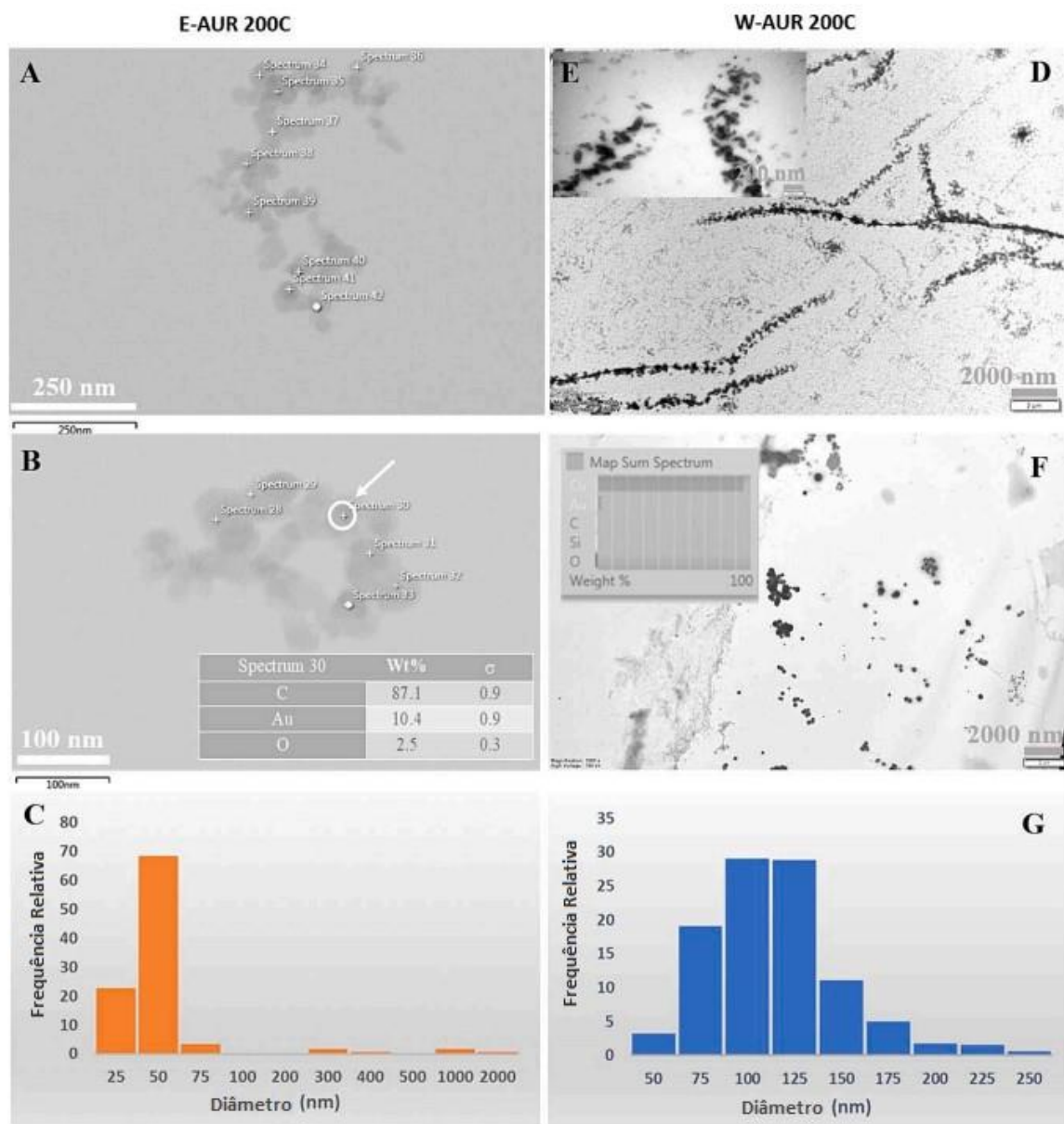


Figura 3. Dados de MET para a potência 200C de AUR. (A-C) Imagens de MET e histograma da frequência relativa dos tamanhos das nanopartículas para as amostras à base de etanol e (D-G) para as amostras à base de água; inserção – dados EDX para os pontos marcados ou o espectro de soma.

### 3.2.1 Classificação de todas as classes, com deep learning, usando o modelo de GRU

Os resultados de classificação espectral Raman para as 11 classes, obtidos utilizando-se o modelo de GRU treinado, são mostrados na Fig. 4; tanto os conjuntos de dados não pré-tratados quanto os pré-tratados por bg foram considerados.

A matriz de confusão é mostrada para fornecer um resumo do número de vezes em que o modelo GRU previu o resultado com precisão ou erroneamente. O modelo

demonstra uma capacidade de reconhecimento muito boa ao comparar as três categorias investigadas; portanto, ele mostra grande eficiência na discriminação entre as categorias AUR, PW e UW, quando dados Raman não pré-tratados são considerados (Fig.4A). Nesse caso, uma precisão de 88% (Tabela 1) pode ser notada; este valor pode ser considerado como muito bom, especialmente se levarmos em conta a grande semelhança entre as classes estudadas. Este valor, que é pouco inferior a 90%, representa principalmente o resultado

de atribuições erradas geradas para diferentes níveis de potencialização, ou de amostras de referência pertencentes à mesma categoria; foram registradas somente 3 atribuições erradas entre as três classes investigadas – AUR, PW e UW (uma mostra de AUR 200C foi associada à UW 200C, e duas amostras de UW 30C foram alocadas em AUR 6C e AUR 200C, respectivamente).

Desta forma, para a categoria AUR, as outras três atribuições errôneas foram devido à semelhança entre os diferentes níveis de potencialização dentro do grupo. Um comportamento similar também foi observado dentro dos grupos PW e UW. Não houve erros relacionados à diferenciação de PW e amostras de AUR ou UW. Dentro dos grupos PW e UW, foi observado o reconhecimento correto para o nível de potência 200C, enquanto para os outros níveis de potencialização, até 5 amostras foram erroneamente atribuídas (esse máximo foi alcançado na classe PW 6C).

Contudo, quando se aplicou o modelo de GRU ao conjunto de dados pré-tratados por bg, o resultado mostrou uma precisão de apenas 59% (Fig. 4B e Tabela 1). Resultados importantes de classificação incorreta foram obtidos dentro dos três grupos investigados, mas houve também atribuições incorretas para amostras fora do grupo adequado. Esses resultados mostram que a precária capacidade de reconhecimento do modelo se dá devido à perda de informações que ocorreu quando a subtração de fundo foi aplicada aos dados Raman. Os grupos AUR e PW parecem ser os mais afetados (Fig. 4B).

A Tabela 1 apresenta uma análise aprofundada dos valores de desempenho da abordagem proposta. Os valores de precisão, retirada e f1 para cada classe foram determinados de forma independente. Os resultados dos experimentos indicaram que

as pontuações macro f1 para as duas bases de dados foram 0,88 e 0,59. Notadamente, as categorias PW, PW 6C, PW 30C e PW 200C apresentaram taxa de reconhecimento estável em ambas as bases de dados. Quando os valores de retirada são considerados, o modelo tende a subestimar a precisão da classificação da amostra UW 30C. A partir dos resultados, pode-se deduzir que, no geral, o poder de discriminação desse modelo para os dados de UW é um pouco limitado. Além do mais, este trabalho investiga a utilização da bem conhecida abordagem de *machine learning*, especificamente as máquinas de vetores de suporte (SVM, em inglês), para a categorização dos dados Raman. Comparada com o método de *deep learning* (GRU), a técnica tradicional de *machine learning* (SVM) gerou as pontuações de menor precisão para as duas bases de dados.

Considerando esses resultados, uma investigação mais aprofundada foi realizada, a saber, uma abordagem inteligente de aumento de dados foi empregada para ampliar o tamanho da base de dados. Assim, usando uma estratégia de segmentação espectral, cada espectro Raman foi dividido em segmentos menores. As dimensões dos segmentos foram de  $1 \times 1024$ . Por exemplo, quando se define um tamanho de amostra como sendo  $1 \times 12733$ , são obtidos um total de mais ou menos 12 segmentos únicos. O banco de dados original contém 15 instâncias para uma determinada classe. Após completar o procedimento de segmentação, a base de dados foi redimensionada para  $1980 \times 1024$ , e consiste em 11 classes distintas. Portanto, o tamanho das amostras por classe se torna 180. A base de dados é, então, fracionada, com 80% alocado para treinamento, e a porção restante reservada para fins de testes. A validação cruzada de cinco dobras foi aplicada para medir o desempenho do nosso modelo GRU nas

bases de dados de segmentação obtidas. Seguindo essa abordagem, descobriu-se que há uma relação direta entre o aumento de tamanho do segmento e a diminuição de desempenho. Os resultados experimentais apresentados na Figura S18 e na Tabela S1, obtidos através do envolvimento das amostras dos conjuntos de testes, demonstram que nosso modelo de GRU alcança uma pontuação de alta precisão, de 99,45% para dados não pré-tratados e

pontuação de precisão perfeita, de 100%, para dados pré-tratados por bg, nas 11 classes. Mesmo que outras investigações envolvendo um maior número de amostras precisem ser realizadas antes de se propor a estratégia de segmentação espectral como sendo a mais apropriada para experimentos contendo um elevado número de classes, essa estratégia pode ser considerada como uma valiosa abordagem de aumento de dados para o nosso tipo de dados.

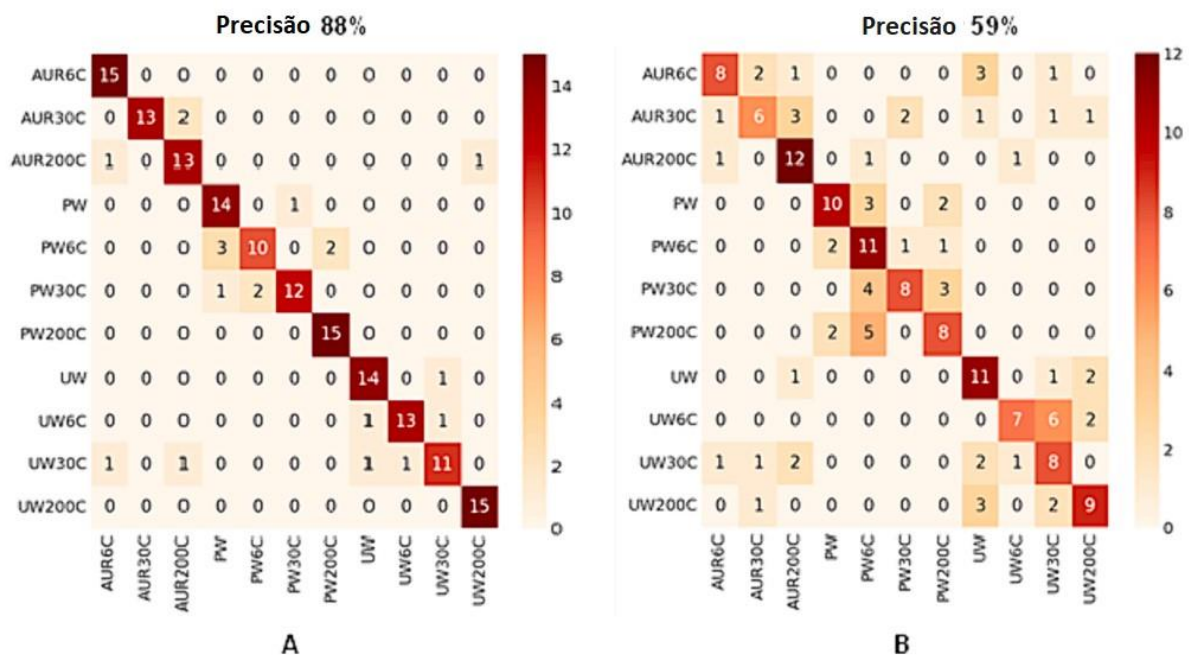


Figura 4. Matriz de confusão do modelo de GRU para (A) dados não pré-tratados e (B) pré-tratados com bg, de todas as categorias investigadas.

Tabela 1  
Resultados de classificação obtidos com dados Raman não pré-tratados e com linha de base subtraída (pré-tratados com bg).

	GRU						SVM					
	não pré-tratado			pré-tratado com bg			não pré-tratado			pré-tratado com bg		
	prec	re	f1	prec	re	f1	prec	re	f1	prec	re	f1
AUR200C	0.88	1.00	0.94	0.73	0.53	0.62	0.64	0.60	0.62	0.35	0.40	0.38
AUR30C	1.00	0.87	0.93	0.60	0.40	0.48	0.52	0.73	0.61	0.10	0.13	0.11
AUR6C	0.81	0.87	0.84	0.63	0.80	0.71	0.36	0.33	0.34	0.17	0.20	0.18
PW	0.78	0.93	0.85	0.71	0.67	0.69	0.75	0.80	0.77	0.55	0.80	0.65
PW200C	0.83	0.67	0.74	0.46	0.73	0.56	0.53	0.53	0.53	0.50	0.53	0.52
PW30C	0.92	0.80	0.86	0.73	0.53	0.62	0.65	0.73	0.69	0.50	0.40	0.44
PW6C	0.88	1.00	0.94	0.57	0.53	0.55	0.64	0.47	0.54	0.17	0.13	0.15
UW	0.88	0.93	0.90	0.55	0.73	0.63	0.69	0.73	0.71	0.18	0.13	0.15
UW200C	0.93	0.87	0.90	0.78	0.47	0.58	0.64	0.60	0.62	0.58	0.47	0.52
UW30C	0.85	0.73	0.79	0.42	0.53	0.47	0.50	0.40	0.44	0.29	0.27	0.28
UW6C	0.94	1.00	0.97	0.64	0.60	0.62	0.80	0.80	0.80	0.55	0.40	0.46
macro avg	0.88	0.88	0.88	0.62	0.59	0.59	0.61	0.61	0.61	0.36	0.35	0.35
	Precisão de 88 %			Precisão de 59 %			Precisão de 61 %			Precisão de 35 %		

### 3.2.2 Classificação das potências dentro de cada grupo, com deep learning, usando o modelo de GRU

A taxa de reconhecimento obtida com o método de DL dentro de cada categoria (AUR 6C, AUR 30C, AUR 200C, PW), (PW, PW 6C, PW 30C, PW 200C) e (UW, UW 6C, UW 30C, UW



200C), foi analisada envolvendo dados Raman não pré-tratados e pré-tratados por bg e os resultados foram comparados em termos de valores de desempenho. A Fig. 5 ilustra os achados do experimento após aplicação da validação cruzada de 15 dobras.

Para alocar as amostras para fins de validação e treinamento, empregamos a técnica de segmentação em 15 dobras, em que 11 amostras foram selecionadas para validação e as amostras restantes foram designadas para treinamento. Para o grupo AUR, a classe nanopotencializada de PW foi utilizada como referência.

No caso de AUR versus PW, as matrizes de confusão demonstram que 98% e 78% de precisão foram obtidos, Fig.5A, D. Os achados mostraram uma precisão de 90 e 75% para o grupo PW, Fig. 5B, E, enquanto valores de precisão de 92% e 68% foram obtidos para o grupo UW, Fig. 5C, F. No geral, os grupos PW6C e UW30C têm baixa performance comparado a outras classes. Após realizar uma análise geral, fica claro que o grupo AUR tem o menor número de classificações incorretas e que a maioria dos erros de classificação ocorre devido ao grande grau de semelhança entre as classes 6C e 30C.

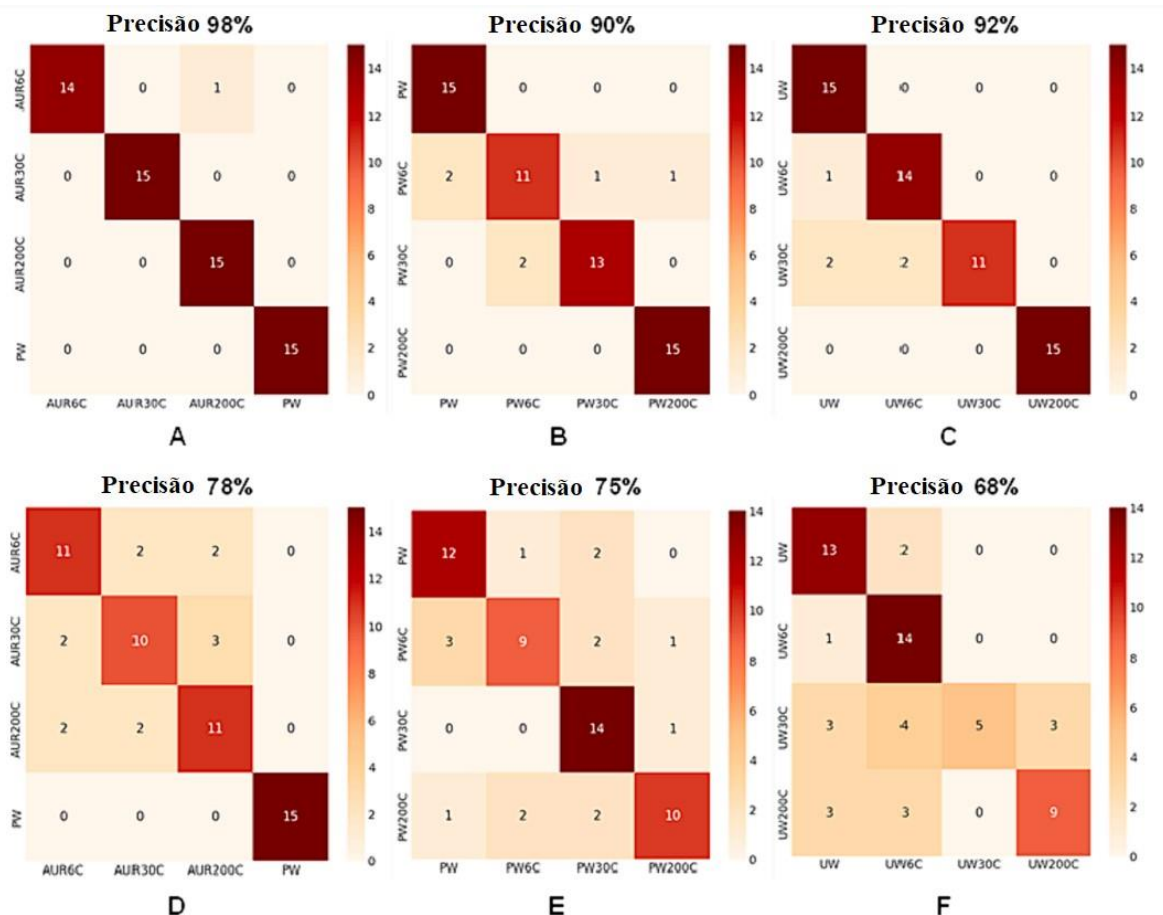


Figura 5. Desempenho do modelo de *deep learning* para avaliar a discriminação dentro de cada grupo usando dados não pré-tratados (A-B-C) e pré-tratados com bg (D-E-F).

### 3.2.3 Classificação com *deep learning*, dentro do mesmo nível de potencialização, usando o modelo de GRU

Adicionalmente, foi analisado o desempenho do DL na discriminação das classes no mesmo

nível de potencialização, baseado em seus espectros Raman (Fig.6). Ao categorizar os níveis de potencialização, nós consideramos cinco classes, incluindo as amostras potencializadas de AUR, PW e UW, e amostras não potencializadas de PW e UW como

referência. A análise dos resultados mostrou que para a potência 6C, valores de precisão de 99% (não pré-tratadas) e 84% (pré-tratadas com bg) foram obtidos a partir do modelo de GRU. Valores de precisão de 95% (não pré-tratadas) e 83% (pré-tratadas com bg) também foram encontrados para a

potência 30C. Para a potência 200C, o modelo de GRU produziu valores de precisão de 97% (não pré-tratadas) e 77% (pré-tratadas com bg). Portanto, o melhor rendimento do modelo de GRU foi observado no caso de soluções de baixa diluição (6C).

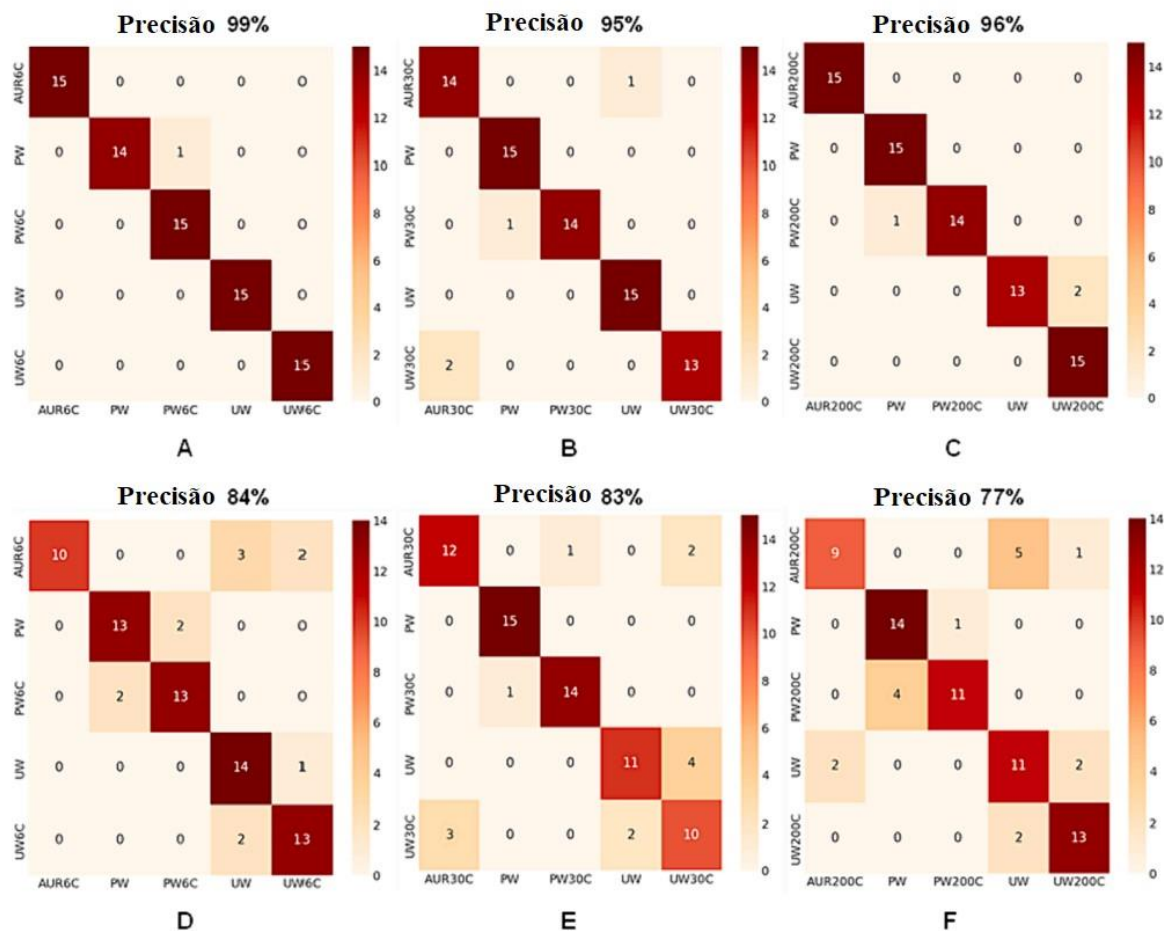


Figura 6. Desempenho do modelo de deep learning para avaliar a discriminação dentro de cada nível de potencialização usando dados não pré-tratados (A-B-C) e pré-tratados com bg (D-E-F).

#### 4. Discussão

A necessidade de encontrar técnicas confiáveis para caracterização eficiente de diluições ultra altas é bem conhecida. Neste estudo, mostramos que é possível usar um conjunto de métodos (MET-EDX e espectroscopia Raman em combinação com DL) para caracterização e diferenciação bem-sucedida de soluções altamente diluídas obtidas após potencialização. MET-EDX podem ser utilizados para avaliar a composição e morfologia de qualquer

solução coloidal. Nós mostramos que essa técnica é eficaz mesmo para soluções altamente diluídas, permitindo-nos obter informações valiosas com relação ao nível de potencialização e, desta forma, discriminá-las, criando uma imagem que pode ser associada à cada nível de potencialização.

Como observação geral, a morfologia da solução de AUR 6C parece similar à das soluções coloidais de nanopartículas de ouro usuais [45]; o tamanho das nanopartículas de ouro depende da natureza da matéria-prima

utilizada no processo de sintetização. No caso das outras duas potências de AUR, 30C e 200C, o design delas parece ser regido pela lei constructal que prevê a engenharia estratégica de novas arquiteturas com base nas leis da física [46].

Si e O são os dois elementos onipresentes nas amostras de AUR 30C, ao passo que nanopartículas isoladas contendo impurezas como ferro (Fe), titânio (Ti), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e alumínio (Al) são observadas na amostra E-AUR 30C, cujos constituintes são menores (Figuras 2 e S5-S7). Essas impurezas são originadas do solvente utilizado ou podem ser formadas durante a potencialização por dissolução dos frascos de vidro (por exemplo o Si ou Ti). O motivo pelo qual essas impurezas são tão evidentes na potência 30C pode ser atribuído ao tamanho dos componentes do remédio, que são menores que os componentes das outras duas potências (6C e 200C), como mostrado nos histogramas das Figuras 1C e G, 2C e G, e 3C e G. Além disso, o perfil filiforme observado na amostra W-AUR 30C (Fig. 2D), a ocorrência de algumas estruturas com base de carbono (C) na E-AUR 30C (Fig. S7B) e a presença de ouro nas duas amostras da potência 30C (inserção da Fig. 2 e Figuras S5 e S8B) devem ser destacadas.

Todas essas observações sugerem uma organização diferente para as potências 6C e 30C de AUR e indicam a presença de nanopartículas e de conjuntos de clusters nas amostras da 30C. Assim, o formato claro das nanopartículas de impurezas e os conjuntos filiformes/de clusters formados a partir de pequenas estruturas promove a ideia de que, pelo menos para ARU 30C, a organização observada não está primariamente relacionada aos sistemas de nanopartículas, mas mais aos grandes conjuntos (clusters) de pequenas estruturas. Provavelmente esses clusters também contém moléculas de etanol

e água (em E-AUR) ou água (em W-AUR), enquanto as impurezas, sejam isoladas ou ligadas a esses grandes conjuntos, aparecem como nanopartículas (formato redondo claro e diferentes tamanhos). Embora ouro tenha sido identificado em todas as amostras investigadas, ele aparece espalhado na superfície da grade nas imagens de mapeamento de MET-EDX. Os resultados obtidos para as amostras de AUR 200C sugerem uma organização das moléculas de AUR 200C, indicando a existência de estruturas estáveis e organizadas em uma grande área. As impurezas estão presentes como grandes aglomerados (Fig. S10B); portanto, grandes impurezas (escala micrométrica) como Si, Al, Fe e O, conectadas, podem ser vistas em resultados de mapeamento por MET-EDX. O perfil filiforme também pode ser notado nas amostras de W-AUR 200C (Fig. 3A, 3D), assim como a ocorrência de algumas estruturas com base de carbono (C) em E-AUR 200C (Figuras S10A e S10C), e a presença de ouro em dois tipos de amostras 200C investigadas (inserção na Fig.3 e Figuras S9 e S11B).

Alguns desses resultados são corroborados pela literatura; por exemplo, a presença de ouro, mesmo em potências altas (30C e 200C) de AUR, que estão além do número de Avogadro, também foi demonstrada nos artigos de Chikramane et al. [10] e Rajendran [47]. No trabalho de Chikramane et al., o componente elementar das partículas de MET foi identificado por difração eletrônica de área selecionada (em inglês, SAED) e confirmado por análise ICP-AES [10]. O estudo de Rajendran destaca a ideia de que as nanopartículas são encontradas principalmente na escala de pontos quânticos em todas as soluções [47]; o tamanho de suas partículas é aproximadamente semelhante aos nossos dados. Essa perspectiva de nanopartículas também é corroborada por

nossos achados, mas além disso, nossos resultados demonstram que a estrutura de AUR combina nanopartículas e arranjos de clusters compostos de nanoestruturas menores ou maiores. Esses arranjos de clusters são mais evidentes nas altas diluições que estão além do número de Avogadro e são influenciados pela natureza do solvente e pelo nível de potencialização; quanto maior a potência, maiores e com mais ramos serão as estruturas formadas. A extensão dessa organização em uma área maior deverá levar a estruturas mais estáveis e que possam estar em conformidade com a lei construtiva (ou lei constructal) de design e evolução da natureza, como descrito por Bejan e Lorente [46].

Adicionalmente, para o estudo MET-EDX, nós investigamos se a metodologia baseada em espectroscopia Raman e DL é capaz de classificar as soluções que não são significativamente diferentes em sua estrutura, como i) as soluções de PW versus de UW, que ostentam diferenças sutis, já que a UW utilizada nesses experimentos é, em essência, uma água parcialmente purificada, usada em cosméticos, e ii) soluções de PW versus de AUR, em que as diferenças se devem à presença de concentrações muito baixas de ouro nas amostras AUR. Ademais, a complexidade e dinâmica das estruturas à base de água produzem uma resposta na região Raman investigada (especialmente na faixa de estiramento OH), como demonstrado por SUN [32] e diversos outros autores [28-31].

Os resultados obtidos para as três situações investigadas (classificação de todas as classes, classificação das potências dentro de cada grupo (AUR, PW e UW) ou classificação dentro do mesmo nível de potencialização (6C, 30C e 200C) demonstram que as abordagens de DL podem ser utilizadas para reconhecer de forma fácil e efetiva as diversas

classes. No conjunto de dados com a remoção de parâmetro (ou seja, pré-tratado com bg) o modelo de GRU é incapaz de captar a tendência dos dados em sua totalidade. Para alcançar melhores resultados para dados pré-tratados com bg, nós empregamos normalização quantizada. Além disso, neste caso, a técnica de normalização em remessa foi aplicada somente após a camada densa final do modelo. Um modelo de dois estágios de reconhecimento pode ser proposto como extensão do presente estudo. O primeiro modelo seria responsável por determinar o tipo de amostra, ao passo que o segundo modelo seria capaz de separar as amostras de teste em subclasses dentro da classe de tipo de amostra. Esse procedimento leva um tempo significativo, mas acreditamos que ele produza resultados superiores. Ademais, com base nos resultados obtidos para o estudo de discriminação envolvendo todas as 11 classes e uma abordagem de aumento de dados, o uso de um método de segmentação espectral pode ser visto como uma estratégia valiosa para aumentar a precisão de previsão do modelo.

## 5. Conclusão

De modo geral, ao analisarmos os resultados obtidos com MET-EDX e com a metodologia baseada na espectroscopia Raman e em algoritmos de DL, podemos defender que esses métodos podem ser utilizados com sucesso para a caracterização de diluições ultra altas. Esse conjunto de técnicas revelou uma modalidade que pode ser a base para a discriminação de diferentes remédios de acordo com a natureza da substância inicial utilizada para preparar os remédios, ou poderia permitir a diferenciação das amostras com base em seu nível de potencialização. Essa abordagem permite a análise de soluções altamente diluídas em uma escala muito maior do que era possível no passado.



## Declaração de contribuição de autoria

**Camelia Berghian-Grosan:** Redação – revisão e edição, Redação – esboço original, Supervisão, Metodologia, Investigação, Curadoria de dados, Conceitualização. **Sahin Isik:** Redação – revisão e edição, Redação – esboço original, Software, Metodologia. **Alin Sebastian Porav:** Redação - revisão e edição, Redação – esboço original, Metodologia, Investigação. **Ilknur Dag:** Redação – revisão e edição, Redação – esboço original, Supervisão, Metodologia. **Kursad Osman Ay:** Redação – revisão e edição, Redação – esboço original, Metodologia, Investigação. **George Vithoukaskas:** Redação – revisão e edição, Redação – esboço original, Metodologia, Conceitualização.

## Declaração de conflito de interesses

Camelia Berghian-Grosan e George Vithoukaskas reportam que os custos de publicação do artigo foram fornecidos pela Academia Internacional de Homeopatia Clássica. George Vithoukaskas relata um relacionamento com a Academia Internacional de Homeopatia Clássica que inclui: ser membro do conselho. Se houver outros autores, eles declaram que não têm interesses financeiros conflitantes ou relações pessoais conhecidas que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

## Disponibilidade dos dados

Os dados serão disponibilizados mediante solicitação.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Academia Internacional de Homeopatia Clássica (I.A.C.H.) - Alonissos (Grécia) - pelo apoio prestado a esta pesquisa e ao Dr. Drosos Kourounis por suas sugestões e correções que melhoraram consideravelmente a qualidade deste artigo.

Agradecimentos especiais são estendidos à Farmácia Korres e ao Sr. George Korres (Grécia, [www.korres.com](http://www.korres.com)) pela preparação das soluções homeopáticas.

## Apêndice A e material suplementar

Dados suplementares a este artigo podem ser encontrados online em <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124537>.

## Referências

- [1] S. Hahnemann, *Organon of Medicine*, 6th ed., B. Jain Publishers (P) Ltd, 2012.
- [2] T.F. Allen, *The encyclopedia of pure materia medica: a record of the positive effects of drugs upon the healthy human organism*, Boericke & Tafel, New York, 1874.
- [3] T.F. Allen, *A handbook of materia medica and homoeopathic therapeutics*, F.E. Boericke, Philadelphia, 1889.
- [4] J.T. Kent, *Lectures on Homoeopathic Materia Medica*, reprint, B. Jain Publications, 2005.
- [5] G. Vithoukaskas, *Materia Medica Viva 1-3*, Homeopathic Book Publishers, London, 1995.
- [6] G. Vithoukaskas, *Materia Medica Viva 4-13*, International Academy of Classical Homeopathy, Alonissos, 1997-2021.
- [7] P. Nandy, A review of basic research on homoeopathy from a physicist's point of view, *Indian J. Res. Homoeopathy* 9 (2015) 141, <https://doi.org/10.4103/0974-7168.166372>.
- [8] P. Bellavite, M. Marzotto, D. Oliosio, E. Moratti, A. Conforti, High-dilution effects revisited. 1. physicochemical aspects, *Homeopathy* 103 (2014) 4–21, <https://doi.org/10.1016/j.homp.2013.08.003>.
- [9] P.S. Chikramane, D. Kalita, A.K. Suresh, S.G. Kane, J.R. Bellare, Why extreme dilutions reach non-zero asymptotes: a nanoparticulate hypothesis based on froth

- flotation, *Langmuir* 28 (2012) 15864–15875, <https://doi.org/10.1021/la303477s>.
- [10] P.S. Chikramane, A.K. Suresh, J.R. Bellare, S.G. Kane, Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: a nanoparticulate perspective, *Homeopathy* 99 (2010) 231–242, <https://doi.org/10.1016/j.homp.2010.05.006>.
- [11] G.S. Anagnostatos, G. Vithoukas, P. Garzonis, C. Tavouxoglou, A working hypothesis for homœopathic microdiluted remedies, *Br. Homoeopath. J.* 81 (1992) 67, [https://doi.org/10.1016/S0007-0785\(05\)80310-2](https://doi.org/10.1016/S0007-0785(05)80310-2).
- [12] M.O. Kokornaczyk, S. Würtenberger, S. Baumgartner, Impact of succussion on pharmaceutical preparations analyzed by means of patterns from evaporated droplets, *Sci. Rep.* 10 (2020) 570, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57009-2>.
- [13] T.W. Randolph, E. Schiltz, D. Sederstrom, D. Steinmann, O. Mozziconacci, C. Schoneich, E. Freund, M.S. Ricci, J.F. Carpenter, C.S. Lengsfeld, Do not drop: mechanical shock in vials causes cavitation, protein aggregation, and particle formation, *J. Pharm. Sci.* 104 (2015) 602–611, <https://doi.org/10.1002/jps.24259>.
- [14] A. Gerhardt, N.R. McGraw, D.K. Schwartz, J.S. Bee, J.F. Carpenter, T.W. Randolph, Protein aggregation and particle formation in prefilled glass syringes, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 1601–1612, <https://doi.org/10.1002/jps.23973>.
- [15] S. Novella, R. Roy, D. Marcus, I.R. Bell, N. Davidovitch, A. Saine, A. Debate, Homeopathy—Quackery or a key to the future of medicine? *J. Altern. Complement. Med.* 14 (2008) 9–15, <https://doi.org/10.1089/acm.2007.0770>.
- [16] V. Elia, M. Niccoli, New physico-chemical properties of extremely diluted aqueous solutions, *J. Therm. Anal. Calorim.* 75 (2004) 815–836, <https://doi.org/10.1023/B:JTAN.0000027178.11665.8f>.
- [17] I. Botha, A.H.A. Ross, A nuclear magnetic resonance spectroscopy comparison of 3C trituration derived and 4C trituration derived remedies, *Homeopathy* 97 (2008) 196–201, <https://doi.org/10.1016/j.homp.2008.08.008>.
- [18] M. van Wassenhoven, M. Goyens, M. Henry, E. Capieaux, P. Devos, Nuclear magnetic resonance characterization of traditional homeopathically manufactured copper (*Cuprum metallicum*) and plant (*Gelsemium sempervirens*) medicines and controls, *Homeopathy* 106 (2017) 223–239, <https://doi.org/10.1016/j.homp.2017.08.001>.
- [19] M. van Wassenhoven, M. Goyens, E. Capieaux, P. Devos, P. Dorfman, Nanoparticle characterisation of traditional homeopathically manufactured *Cuprum metallicum* and *Gelsemium sempervirens* medicines and controls, *Homeopathy* 107 (2018) 244–263, <https://doi.org/10.1055/s-0038-1666864>.
- [20] F. Esposito, U. Wolf, S. Baumgartner, NMR relaxation time investigation of highly diluted aqueous solutions of silica-lactose, *J. Mol. Liq.* 337 (2021) 115975, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115975>.
- [21] M. van Wassenhoven, M. Goyens, M. Henry, J. Cumps, P. Devos, Verification of nuclear magnetic resonance characterization of traditional homeopathically manufactured metal (*Cuprum metallicum*) and plant (*Gelsemium sempervirens*) medicines and controls, *Homeopathy* 110 (2021) 042–051, <https://doi.org/10.1055/s-0040-1710022>.

- [22] M. van Wassenhoven, M. Goyens, P. Dorfman, P. Devos, Particle characterisation of traditional homeopathically manufactured medicine cuprum metallicum and controls, *Int J High Dilution Res* 20 (2021) 11–28. <https://doi.org/10.51910/ijhdr.v20i4.1113>.
- [23] M. van Wassenhoven, B. Nysten, M. Goyens, P. Dorfman, P. Devos, D. Magnin, The ion partition detected in homeopathically manufactured medicine cuprum metallicum and controls, *Int. J. High Dilution Res.* 21 (2022) 67–84. <https://doi.org/10.51910/ijhdr.v21icf.1181>.
- [24] H.N. Bhargaw, M. Sharma, A.K. Srivastava, N. Nambison, M.K. Gupta, M. R. Jadhav, K.S. Gavel, P.K. Baghel, M. Ahmed, Unraveling the low-frequency triggered electromagnetic signatures in potentized homeopathic medicine, *Mater. Sci. Eng. B* 292 (2023) 116365, <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2023.116365>.
- [25] E. Davenas, F. Beauvais, J. Amara, M. Oberbaum, B. Robinzon, A. Miadonnai, A. Tedeschi, B. Pomeranz, P. Fortner, P. Belon, J. Sainte-Laudy, B. Poitevin, J. Benveniste, Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE, *Nature* 333 (1988) 816–818, <https://doi.org/10.1038/333816a0>.
- [26] G. Vithoulkas, The controversy over the “Memory of Water”, *Med. Sci. Hypotheses* 4 (2017) 1–6. <https://doi.org/10.12659/MSH.901167>.
- [27] B. Bagchi, *Water in biological and chemical processes: from structure and dynamics to function*, Cambridge University Press, 2013.
- [28] A. Nilsson, L.G.M. Pettersson, The structural origin of anomalous properties of liquid water, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8998, <https://doi.org/10.1038/ncomms9998>.
- [29] L.G.M. Pettersson, R.H. Henchman, A. Nilsson, Water-the Most Anomalous Liquid, *Chem. Rev.* 116 (2016) 7459–7462, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00363>.
- [30] J. Liu, X. He, J.Z.H. Zhang, L.-W. Qi, Hydrogen-bond structure dynamics in bulk water: insights from ab initio simulations with coupled cluster theory, *Chem. Sci.* 9 (2018) 2065–2073, <https://doi.org/10.1039/C7SC04205A>.
- [31] F. Perakis, L. De Marco, A. Shalit, F. Tang, Z.R. Kann, T.D. Kühne, R. Torre, M. Bonn, Y. Nagata, Vibrational spectroscopy and dynamics of water, *Chem. Rev.* 116 (2016) 7590–7607, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00640>.
- [32] Q. Sun, The Raman OH stretching bands of liquid water, *Vib. Spectrosc* 51 (2009) 213–217, <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2009.05.002>.
- [33] S. Guo, J. Popp, T. Bocklitz, Chemometric analysis in Raman spectroscopy from experimental design to machine learning-based modeling, *Nat. Protoc.* 16 (2021) 5426–5459, <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00620-3>.
- [34] C.M. Bishop, *Neural networks for pattern recognition*, Clarendon Press, Oxford, 1995.
- [35] A. Gron, *Hands-on machine learning with Scikit-learn, Keras, and tensorflow: concepts, tools, and techniques to build intelligent systems*, 2nd ed., O’Reilly Media, 2019.
- [36] J.F. Díez-Pastor, S.E. Jorge-Villar, A. Arnaiz-Gonzalez, C.I. García-Osorio, Y. DíazAcha, M. Campeny, J. Bosch, J.C. Melgarejo, Machine learning algorithms applied to Raman spectra for the identification of variscite originating from the

- mining complex of Gava, J. Raman Spectrosc. 51 (2020) 1563–1574, <https://doi.org/10.1002/jrs.5509>.
- [37] J. Houston, F.G. Glavin, M.G. Madden, Robust classification of high-dimensional spectroscopy data using deep learning and data synthesis, J. Chem. Inf. Model. 60 (2020) 1936–1954, <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01037>.
- [38] F. Lussier, V. Thibault, B. Charron, G.Q. Wallace, J.-F. Masson, Deep learning and artificial intelligence methods for Raman and surface-enhanced Raman scattering, TrAC Trends Anal. Chem. 124 (2020) 115796, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115796>.
- [39] Y. Lecun, L. Bottou, Y. Bengio, P. Haffner, Gradient-based learning applied to document recognition, Proc. IEEE 86 (1998) 2278–2324, <https://doi.org/10.1109/5.726791>.
- [40] K. Cho, B. Van Merriënboer, C. Gulcehre, D. Bahdanau, F. Bougares, H. Schwenk, Y. Bengio, Learning Phrase Representations using RNN Encoder–Decoder for Statistical Machine Translation, in: Proceedings of the 2014 Conference on Empirical Methods in Natural Language Processing (EMNLP), Association for Computational Linguistics, Doha, Qatar, 2014: pp. 1724–1734. <https://doi.org/10.3115/v1/D14-1179>.
- [41] M.H. Wathsala N. Jinadasa, A. C. Kahawalage, M. Halstensen, N.-O. Skeie, K.-J. Jens, Deep Learning Approach for Raman Spectroscopy, in: C. Shakher Pathak, S. Kumar (Eds.), Recent Developments in Atomic Force Microscopy and Raman Spectroscopy for Materials Characterization, IntechOpen, 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99770>.
- [42] R. Pascanu, T. Mikolov, Y. Bengio, On the difficulty of training Recurrent Neural Networks, 2013. <https://doi.org/10.48550/ARXIV.1211.5063>.
- [43] KORRES Homeopathic Production Unit, An Introduction to Homeopathic Pharmacopoeia and Production Guidelines, (n.d.). <https://youtube/NkNe-33Q008> (accessed April 23, 2023).
- [44] OriginPro, OriginLab Corporation. Create and Subtract Baseline with Peak Analyzer <https://www.originlab.com/doc/Tutorials/Create-Subtract-Baseline> (accessed March 12, 2024).
- [45] F. Chen, Y. Wang, J. Ma, G. Yang, A biocompatible synthesis of gold nanoparticles by tris(hydroxymethyl)aminomethane, Nanoscale Res. Lett. 9 (2014) 220, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-220>.
- [46] A. Bejan, S. Lorente, The constructal law of design and evolution in nature, Phil. Trans. R. Soc. B 365 (2010) 1335–1347, <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0302>.
- [47] E.S. Rajendran, Homeopathy a material science: nanoparticle characterization of Aurum metallicum 6C, 30C, 200C, 1000C, 10000C, 50000C and 100000C, Int. J. Curr. Res. 9 (2017) 48923–48927.