

# Análisis de diluciones ultra altas: Exploración de los efectos de la potenciación mediante microscopía electrónica, espectroscopia Raman y aprendizaje electrónico profundo

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

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo de Tecnologías Isotópicas y Moleculares, Cluj-Napoca 400293, Rumania

<sup>d</sup> Departamento de Ingeniería Informática, Universidad Eskisehir Osmangazi, Eskisehir 26480, Turquía

<sup>c</sup> Centro de Investigación y Aplicación del Laboratorio Central de Investigación, Universidad Eskisehir Osmangazi, Eskisehir 26480, Turquía

<sup>d</sup> Escuela secundaria de servicios vocacionales de salud, Universidad Eskisehir Osmangazi, Eskisehir 26480, Turquía

<sup>e</sup> Universidad del Egeo, Mitilene 81100, Grecia

## INFORMACIÓN

Palabras clave:  
Aurum Metallicum  
Ultra-altas diluciones  
Potenciación  
Conjunto de racimos  
Inteligencia artificial  
Datos Raman

## RESUMEN

El tema de las diluciones ultra altas ha sido objeto de continuo debate a lo largo de los años, principalmente porque las posibilidades de analizar dichas soluciones diluidas son limitadas. En este contexto, se llevaron a cabo investigaciones de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para evaluar las características morfológicas de soluciones de oro altamente diluidas a base de etanol y agua; Se examinaron tres niveles de potenciación (6C, 30C y 200C) para cada tipo de solución. Además, se emplearon espectroscopia Raman y algoritmos de aprendizaje profundo (DL) para el análisis de los tres niveles de potenciación de agua purificada, agua no purificada y soluciones de oro a base de agua purificada. Se evaluaron tres lotes para cada categoría considerada, y se presentó y discutió la capacidad de discriminar entre todas las clases investigadas, entre las potencias dentro de cada grupo o entre las clases dentro del mismo nivel de potenciación en correlación con los hallazgos de TEM. TEM reveló distintas formas de organización para los tres niveles de potenciación, mientras que el modelo de unidad recurrente cerrada (GRU) mostró una gran precisión (88 %) para discriminar todas las clases, más del 90 % de precisión para distinguir las muestras dentro de cada grupo y más del 95 % de precisión para la clasificación dentro del mismo nivel de potenciación si se utilizaron espectros Raman sin tratamiento previo. Por lo tanto, este conjunto de métodos (TEM-EDX y espectroscopia Raman en combinación con DL) se puede utilizar con éxito para la caracterización y diferenciación de soluciones altamente diluidas resultantes del tratamiento de potenciación. Además, considerando los resultados obtenidos del estudio de discriminación que involucra las 11 clases y un enfoque de aumento de datos, el método de segmentación espectral puede verse como una estrategia valiosa para aumentar la precisión de la predicción del modelo.

## 1. Introducción

La potenciación es un proceso que implica sucesivas diluciones y sucusiones (sacudidas vigorosas); Fue introducido por primera vez por el médico alemán Samuel Hahnemann, quien observó que las soluciones de sustancias que han pasado por este proceso tienen un efecto biológico en los humanos, con evidencia terapéutica.[1]. Hasta la fecha se han utilizado

numerosos remedios homeopáticos y están muy bien documentados [2–6]; se derivan de una amplia variedad de sustancias que se someten a potenciación para obtener sus propiedades curativas. Varias perspectivas reveladoras han intentado explicar la acción de los remedios homeopáticos [7-11]. El impacto de la sucusión (sacudida vigorosa) en algunos preparados

farmacéuticos, como la Equinácea  $10^{-2}$ , Baptisia  $10^{-3}$ , Baptisia  $10^{-4}$ , Luffa  $10^{-4}$  y Spongia  $10^{-6}$  se destacó recientemente mediante la ayuda de la evaporación de gotas y el análisis estadístico; las muestras se fabricaron de acuerdo con las normas de la Farmacopea Europea para medicamentos homeopáticos, y los autores emplearon 0, 10 o 100 golpes de succión. Los resultados mostraron diferencias significativas para todas las preparaciones investigadas [12]. Además, los efectos de los choques mecánicos (es decir, agitación, caída) sobre las soluciones proteicas son bien conocidos, y se han investigado y propuesto medidas para mitigar estos efectos en algunos estudios [13,14]. Sin embargo, para la homeopatía, agitar junto con la dilución es una herramienta esencial para la preparación de remedios. Una preocupación importante con respecto a las soluciones potenciadas en altas diluciones (30C, 200C, etc.) más allá del número de Avogadro, que establece el límite de dilución (12C) más allá del cual la sustancia original no puede estar presente, es que el material inicial no se espera encontrar ni en la menor cantidad [15]. Sin embargo, en un estudio basado en medicamentos obtenidos de metales, Chikramane et al. [10] demostraron la presencia de los materiales iniciales, en forma de nanopartículas, en diluciones extremas de 30C y 200C mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de electrones y espectroscopía de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente (ICP-AES). Se han utilizado diversas técnicas a lo largo de los años para la caracterización de remedios preparados homeopáticamente, destacando la existencia de estructuras específicas incluso en medicamentos altamente diluidos [16–24]. Sin embargo, dentro de la comunidad científica, es bien conocido que el experimento de Benveniste [25], poco después de la publicación de sus resultados, fue demostrado falso por un comité científico enviado por la revista Nature al laboratorio del autor, como explicó George Vithoulkas en su artículo, “La controversia sobre la memoria del agua” [26]. El agua es un solvente especial que juega un papel importante en los procesos biológicos y químicos [27]. Por lo tanto, comprender las propiedades anómalas del agua líquida ha sido de continuo interés, y se han llevado a cabo muchos estudios experimentales y teóricos para entender su estructura [28,29]. No obstante, la estructura y dinámica del agua aún están en continuo debate [30]. La sensibilidad del modo de estiramiento del OH a diferentes entornos locales permite el uso de espectroscopía vibracional en el estudio de la estructura y dinámica del agua líquida [28]. La investigación del agua líquida mediante espectroscopía infrarroja y Raman revela picos amplios en la región de estiramiento del OH, sugiriendo múltiples contribuciones subyacentes (de varias especies inducidas por diferentes arreglos locales de enlaces de hidrógeno), mientras que se pueden ver

claramente picos distintos en los espectros del hielo [31]. En 2009, Sun [32] analizó el agua líquida bajo condiciones ambientales mediante espectroscopía Raman y propuso la deconvolución de la región de estiramiento del OH en cinco sub-bandas. Sin embargo, debido a la complejidad del agua y las altas diluciones de las soluciones investigadas, dicho análisis es una tarea muy difícil. Para abordar estas dificultades, se han aplicado técnicas quimiométricas y, más recientemente, modelos de aprendizaje automático (ML) a señales Raman para el análisis y aprendizaje de datos [33]. Los algoritmos de ML están ganando popularidad creciente en aplicaciones de clasificación [34,35]. Recientemente, métodos tradicionales y de aprendizaje profundo han sido aplicados con éxito para discriminar los espectros Raman de varios materiales complejos (es decir, minerales) o clasificar datos espectroscópicos de alta dimensión [36–38]. El aprendizaje profundo (DL) es un subcampo del ML que es sustancialmente más robusto que los métodos basados en ingeniería de características utilizados en el pasado. Los enfoques de DL tienen muchos beneficios, incluyendo ser eficientes en tiempo, no requerir construcción de características y proporcionar resultados superiores. Las redes neuronales artificiales, conocidas como ANNs, son los precursores de las técnicas de DL. Las ANNs consisten en una capa de entrada, una o más capas intermedias (capas) y una capa de salida. Estos enfoques a menudo se entrenan mediante aprendizaje supervisado, lo que significa que se utilizan etiquetas predefinidas para un conjunto de datos en el proceso de entrenamiento. La red neuronal convolucional (CNN) [39], una de las redes de DL más representativas, es un tipo de red neuronal de retroalimentación directa que utiliza operaciones de convolución y un gran número de filtros. Hay muchos tipos diferentes de algoritmos de aprendizaje basados en convolución que se pueden utilizar según la tarea deseada. Típicamente, se utilizan modelos CNN 2-D para aplicaciones basadas en imágenes. Las unidades recurrentes cerradas (GRU) [40,41] y los modelos CNN 1-D se utilizan para manejar tareas de predicción o clasificación basadas en series temporales. La motivación clave es que los modelos recurrentes tienen la capacidad potencial de preservar relaciones a largo plazo entre datos secuenciales. Estos enfoques proporcionan una cantidad sustancial de ayuda para resolver el problema del gradiente desvanecido [42]. **El presente trabajo investiga la organización estructural de soluciones potenciadas basadas en etanol y agua de oro, un remedio homeopático llamado Aurum Metallicum (AUR).** Tres soluciones altamente diluidas (6C, 30C y 200C) de AUR fueron sometidas a análisis TEM por dos laboratorios independientes ubicados en Rumania y Turquía. Ambas instituciones confirmaron diferentes organizaciones de estas soluciones. La elección de estas diluciones

centesimales se motivó por la necesidad de investigar soluciones que contienen bajas cantidades de la sustancia inicial, incluso más allá del número de Avogadro (es decir, las dos últimas diluciones investigadas). También se obtuvieron espectros Raman para varias soluciones potenciadas basadas en agua (agua purificada (PW), agua no purificada (UW) y solución de oro basada en PW (AUR)) y procesadas por algoritmos de DL para investigar la capacidad de los modelos GRU para discriminar entre todas estas soluciones y clasificar las muestras dentro de las categorías investigadas (AUR, PW y UW) o dentro de los tres niveles de potenciación (6C, 30C y 200C). Se utilizó DL para evaluar su eficiencia en la clasificación de espectros Raman. Se asume que los valores espectrales Raman son valores de series temporales; por lo tanto, aplicamos una red neuronal recurrente. Realizamos experimentos con el modelo GRU ya que resuelve tanto el problema del gradiente desvanecido como el problema de velocidad. Así, probamos la capacidad de este enfoque de clasificación para ser utilizado, en combinación con la espectroscopía Raman, para el análisis de soluciones basadas en agua obtenidas después de la potenciación. Nuestros resultados nos permitieron probar que este conjunto de métodos (TEM-EDX y espectroscopía Raman en combinación con DL) puede ser utilizado con éxito para la caracterización y diferenciación de soluciones altamente diluidas resultantes del tratamiento de potenciación.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Materiales

Todas las soluciones investigadas fueron preparadas por la empresa Korres (Atenas, Grecia), una empresa certificada por la Agencia Nacional de Medicamentos (EOF - Grecia). Estas soluciones se produjeron de acuerdo con la Farmacopea Homeopática Alemana (GHP), adhiriéndose a las directrices de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) [43], y teniendo en cuenta los procedimientos de la Farmacopea Europea para las pruebas de conformidad, con algunas excepciones claramente indicadas. Específicamente, las excepciones se refieren a los solventes utilizados en el paso final del proceso de preparación: 50 % v/v de etanol para las soluciones basadas en etanol y agua purificada para las soluciones basadas en agua. Las soluciones se categorizaron, según el material inicial, en tres grupos: agua purificada (PW), agua no purificada (UW) y Aurum Metallicum (AUR). Para cada categoría, se prepararon tres niveles de potencia (6C, 30C y 200C), con tres lotes de cada nivel de potencia producidos en diferentes días. La notación C está asociada con la dilución centesimal y significa 1 parte de la solución concentrada/solución previamente

potenciadas por 99 partes de eluyente (masa/masa). Para las muestras de PW y UW, el objetivo era preparar soluciones potenciadas que sean análogas a las soluciones medicinales en todos los aspectos excepto por la ausencia de un ingrediente medicinal activo. PW (conformidad según la Farmacopea Europea – Ph. Eur.) se usa generalmente para la preparación de remedios homeopáticos, mientras que UW está parcialmente purificada. Los tipos de agua empleados en este estudio tenían las siguientes características, según lo indicado por la empresa Korres: PW – conductividad 0.7–0.88  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , pH 6.4–6.8,  $\text{NO}_3^- < 0.2$  ppm, e iones metálicos, Al  $< 3\text{--}5$  ppb, As  $< 0.005$  ppm, Pb 0.00032 ppm, Cd  $< 0.001$  ppm, Hg  $< 0.0005$  ppm (metales pesados totales 0.00682 ppm, límite  $< 0.1$  ppm); UW - conductividad 196  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , pH 7.8,  $\text{HCO}_3^-$  66 ppm,  $\text{Cl}^-$  22 ppm,  $\text{NO}_3^-$  9.8 ppm, Na<sup>+</sup> 15 ppm, Ca<sup>2+</sup> 10 ppm, Mg<sup>2+</sup> 8.8 ppm, CO<sub>2</sub> 9.7 ppm. Así, se utilizó como material inicial agua purificada Ph. Eur. y agua no purificada respectivamente. El agua purificada Ph. Eur. también se empleó en el proceso de dilución y, debido a los fines experimentales específicos, en los procesos de preparación de las soluciones PW y UW de 30C y 200C. Para la categoría AUR, se involucró un método basado en la trituración de Aurum Metallicum con lactosa monohidratada, como vehículo, hasta el nivel 4C; luego, para obtener la potencia líquida 6C, el protocolo empleó agua purificada (conformidad según la Ph. Eur.) para la preparación de la potencia 5C y etanol al 30 % (m/m) para la fabricación de la dilución líquida 6C. Desde la 6C hasta la 29C, y consecuentemente hasta la C199, se utilizó agua purificada Ph. Eur. en el proceso de preparación. Las soluciones potenciadas finales de 30C y 200C se produjeron con etanol al 50 % (v/v) para las soluciones AUR basadas en etanol. Debido a los fines experimentales específicos, se utilizó agua purificada Ph. Eur. en los procesos de preparación de las soluciones AUR basadas en agua de 30C y 200C.

#### 2.1.1. Microscopía electrónica de transmisión

Para los estudios TEM, se involucraron dos tipos de muestras de AUR; el primer tipo, AUR preparado en solución de etanol al 50 % v/v, fue analizado en Rumanía y se denominó E-AUR, mientras que el segundo tipo de AUR se preparó solo en agua purificada (PW) y se sometió a análisis en Turquía (denominado W-AUR). Para ambos tipos de AUR, se investigaron tres muestras potenciadas, a saber, 6C, 30C y 200C.

#### 2.1.2. Investigaciones Raman

Para las investigaciones Raman, se utilizaron tres tipos de soluciones: agua purificada (PW), agua no purificada (UW) y AUR. Además, para los grupos PW y UW, se consideraron muestras no potenciadas

(muestras de referencia de los tipos de agua utilizados para el proceso de potenciación) y tres tipos de muestras de agua potenciadas (6C, 30C y 200C); para cada tipo de muestra de agua potenciada, se prepararon tres lotes en tres días diferentes. Para la categoría AUR, solo se investigaron las soluciones potenciadas basadas en agua. Esto significa que se consideraron un total de 12 muestras para PW, 12 muestras para UW y 9 muestras para AUR.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Procedimientos TEM y EDX rumanos

La caracterización estructural y morfológica de las muestras de AUR se realizó en un microscopio electrónico de transmisión de barrido Hitachi HD-2700 (STEM) equipado con un detector de electrones secundarios (SE), un detector de electrones transmitidos (TE) (Hitachi High Tech., Japón) y una pistola de emisión de campo frío diseñada para imágenes de alta resolución (HRTEM) con una resolución de 0.144 nm. Las rejillas de TEM recubiertas de carbono se trataron con 6  $\mu$ l de las soluciones potenciadas de AUR, que se habían sucusionado 10 veces previamente para homogenización. Después de 1–2 minutos, el exceso de líquido se secó con papel de filtro Whatman grado 1, y las rejillas se dejaron secar al aire. Las muestras se analizaron utilizando el sistema STEM operado a 200 kV. Se utilizó un sistema EDX dual que consta de un detector de deriva de silicio (SDD) X-Max N100TLE (Oxford Instruments) para las investigaciones EDX.

### 2.2.2. Procedimientos TEM y EDX turcos

Las imágenes TEM de las tres potencias (6C, 30C y 200C) de AUR se obtuvieron utilizando un TEM Hitachi HT 7800 operando a un voltaje de aceleración de 100 kV. Después de que cada muestra se agitó 10 veces, se goteó 1 gota sobre una rejilla recubierta de carbono y se dejó secar en un ambiente limpio. El análisis EDX de las muestras se realizó utilizando un Oxford Instruments X-MaxN conectado al mismo dispositivo TEM para confirmar la presencia de oro. Los histogramas preparados para ambas imágenes TEM, rumanas y turcas, se realizaron basándose en datos obtenidos con el software ImageJ (NIH, EE. UU.).

### 2.2.3. Espectroscopía Raman

Los espectros Raman se registraron en un espectrómetro Raman NRS-3300 (Jasco, Japón) equipado con un detector de dispositivo acoplado por carga (CCD) utilizando excitación láser de 514.5 nm (luz verde). Las soluciones se analizaron en tubos capilares de vidrio (Marienfeld, Alemania) con un diámetro de 1.5–1.6 mm. Se utilizó un objetivo Olympus UMPLFL 20X, una rejilla de 600 l/mm, una

rendija de 0.1  $\times$  6 mm, un tiempo de exposición de 120 s y tres escaneos para registrar los espectros Raman de aproximadamente 72  $\text{cm}^{-1}$  a 4020  $\text{cm}^{-1}$ . El pico de 521  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a Si, se utilizó para calibrar el espectrómetro. Los datos en bruto y ruidosos no se desentonaron ni suavizaron, y no se eliminaron valores atípicos del conjunto de datos. El preprocesamiento de datos involucró dos pasos principales y se realizó con Spectra Manager (JASCO) y OriginPro 2023 (OriginLab Corporation). El primer paso de pretratamiento de datos seleccionó un intervalo de número de onda de 180 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  y limitó el número de características a menos de 13,000 aplicando un método de spline de 3er orden con un intervalo de datos de 0.3. Estos datos se normalizaron adicionalmente a [0,1] y se consideraron para la investigación DL como datos Raman no pretratados. El segundo paso involucró un proceso de sustracción de línea base (bg) que se aplicó en OriginPro a los datos obtenidos, antes de la normalización, del primer paso. Para aplicar el proceso bg, se realizaron los siguientes pasos: modo de línea base definido por el usuario, método de la 2ª derivada (ceros) para la detección de puntos de anclaje, ajuste al espectro, método de interpolación lineal y el mismo número de puntos de línea base que datos de entrada [44]. Los datos obtenidos se normalizaron adicionalmente a [0,1] antes de su uso en la construcción de los conjuntos de datos pretratados bg para el estudio DL.

### 2.2.4. Aprendizaje profundo

Las investigaciones DL se llevaron a cabo utilizando el lenguaje de programación Python y Colab Pro, que proporciona un entorno de computación acelerada. El modelo GRU se construyó y entrenó utilizando la biblioteca Keras 2.12.0. La GPU Colab Tesla T4 se utilizó para entrenar el modelo con un tamaño de lote grande. La Tesla T4 tiene un total de 2560 núcleos CUDA, así como computación 3.7, 15 GB de memoria y VRAM GDDR6. Además, se utilizó el paquete Sklearn 1.2.2 para analizar y explicar los hallazgos obtenidos. Se presentan más detalles sobre el protocolo para las investigaciones DL en el archivo de Material Suplementario y en las Figs. S1 y S2.

## 3. Resultados

Para determinar la capacidad de nuestro método propuesto para la caracterización de varias soluciones y potencias, primero nos propusimos determinar las propiedades de las muestras mediante análisis TEM.

### 3.1 Investigación TEM

TEM es una herramienta valiosa que proporciona datos fundamentales sobre la organización de nanomateriales; este conocimiento es muy importante para la comprensión y el desarrollo en ciencia de materiales, así como para campos que utilizan soluciones altamente diluidas que también están compuestas de nanoestructuras.

### 3.1.1. *Aurum Metallicum 6C*

La Fig. 1 presenta varias imágenes TEM obtenidas con dos instrumentos diferentes (ver sección de Métodos) para la potencia 6C de AUR. Se emplearon dos medios diferentes para la preparación de muestras: el primer medio fue una solución de etanol al 50 % v/v, que se utilizó para las muestras de AUR analizadas en Rumanía (E-AUR 6C). El segundo medio fue agua purificada, que se empleó para las muestras investigadas en Turquía (W-AUR 6C). A pesar de las diferencias subyacentes en los solventes, las imágenes TEM obtenidas son bastante similares en cuanto a la forma de las nanopartículas. Sin embargo, el tamaño de las nanopartículas depende del tipo de solvente. Esto se revela en los histogramas de las dos muestras, indicando nanopartículas más pequeñas para E-AUR 6C que para W-AUR 6C (Fig. 1C y G), probablemente porque el etanol es más efectivo como agente estabilizador que el agua. Los datos EDX (recuadros de la Fig. 1 y Figs. S3 y S4) muestran porcentajes comparables de oro (Au) en ambas muestras y la presencia de silicio (Si) y oxígeno (O) (el cobre (Cu) es de la rejilla).

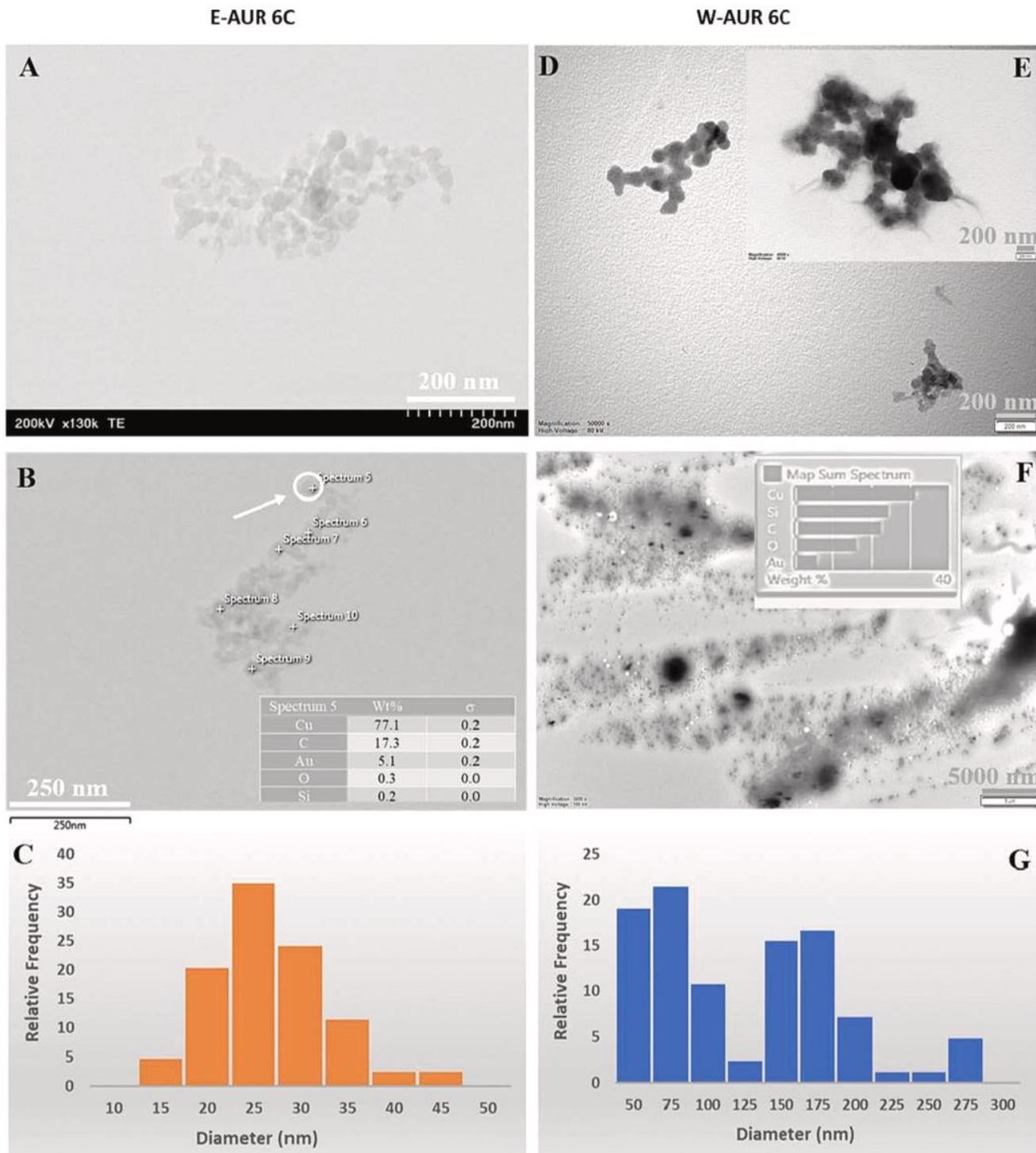
### 3.1.2. *Aurum Metallicum 30C*

Además, se investigó la potencia 30C de AUR; la Fig. 2 y las Figs. S5-S8 muestran las imágenes TEM, los datos EDX y los resultados del mapeo TEM-EDX para esta potencia. Aquí, vale la pena mencionar las similitudes entre las dos muestras, E-AUR 30C y W-AUR 30C, en términos de la forma de la nanoestructura y la apariencia de impurezas. Al igual que en el caso anterior, la potencia 6C, el tamaño de las

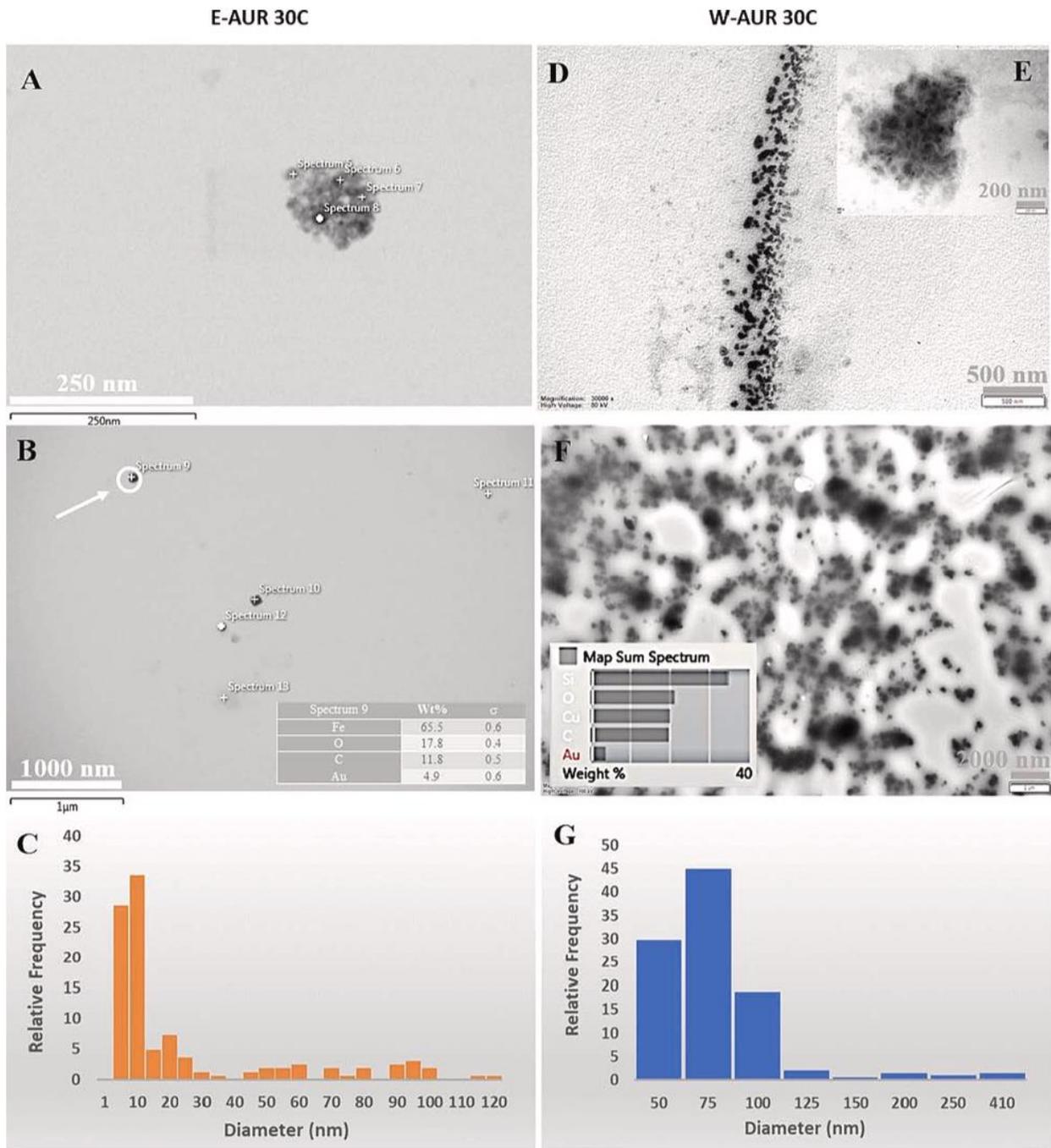
nanopartículas/nanoestructuras de la potencia 30C tiende a ser más pequeño para E-AUR que para W-AUR (Fig. 2C y G); este comportamiento se explica por la capacidad del etanol para actuar como un agente estabilizador eficiente. Además, los histogramas en las Figs. 1 y 2 indican nanoestructuras más pequeñas en E-AUR 30C que en E-AUR 6C y una disminución significativa en el tamaño de más de 150 nm en comparación con las muestras basadas en agua; estas grandes estructuras se ven claramente en W-AUR 6C, pero son visibles solo en trazas en la muestra W-AUR 30C. Este cambio significativo entre los perfiles de las dos potencias, 6C y 30C, aparece después del proceso de potenciación, que implica varias diluciones sucesivas y sucusiones.

### 3.1.3. *Aurum Metallicum 200C*

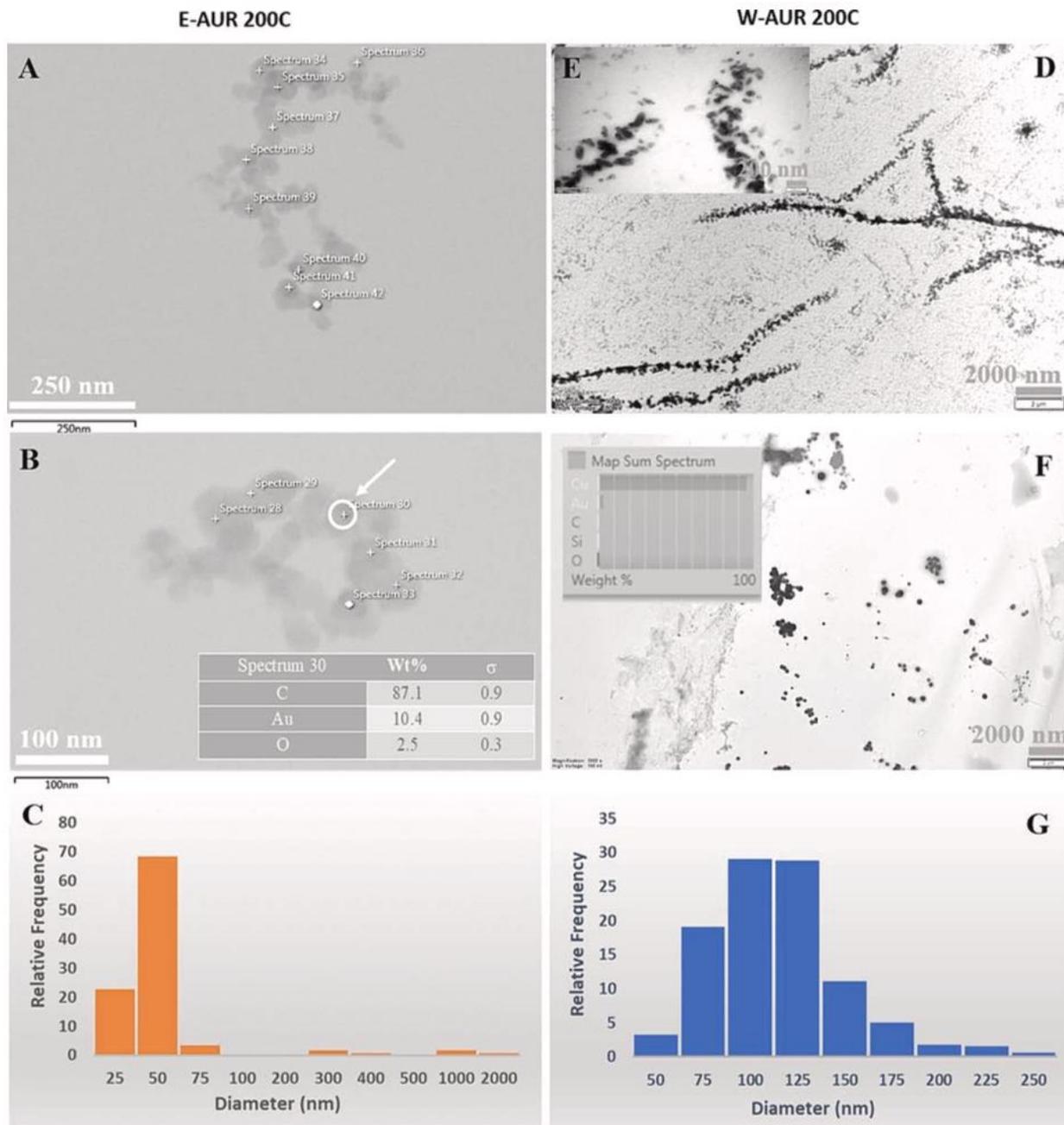
Las características de la potencia 200C se ilustran en la Fig. 3 y en las Figs. S9-S11 y se obtuvieron analizando dos muestras (E-AUR 200C - preparadas usando una solución acuosa de etanol al 50 % v/v y W-AUR 200C - obtenida solo con agua purificada). La tendencia general observada para las potencias 6C y 30C también está presente aquí; más precisamente, el tamaño de las nanoestructuras en la muestra E-AUR 200C es menor que en las W-AUR 200C, como se revela en los histogramas de la Fig. 3. Además, para ambas muestras de 200C, las nanopartículas son más grandes que las observadas en la potencia 30C y son muy diferentes en tamaño y forma de las nanopartículas en la potencia 6C (Figs. 1-3). Una organización distinta y una total falta de impurezas dentro de algunos ensamblajes de clústeres de AUR 200C son evidentes en la Fig. 3B. Además, ambas muestras de AUR 200C muestran un modo de ensamblaje preferencial ramificado (Fig. 3A y D), y la presencia de pequeñas cantidades de impurezas como Si y Fe en estos clústeres se demuestra por los datos EDX presentados en el recuadro de la Fig. 3 y en las Figs. S9 y S11B.



**Fig. 1.** Datos TEM para la potencia 6C del AUR. (A-C) Imágenes TEM e histograma de la frecuencia relativa de tamaños de nanopartículas para las muestras de AUR basadas en etanol y (D-G) para las muestras a base de agua; recuadro - datos EDX para los puntos marcados o el espectro de suma.



**Fig. 2.** Datos TEM para la potencia 30C del AUR. (A-C) Imágenes TEM e histograma de la frecuencia relativa de tamaños de nanopartículas para las muestras de AUR basadas en etanol y (D-G) para las muestras a base de agua; recuadro - datos EDX para los puntos marcados o el espectro de suma.



**Fig. 3.** Datos TEM para la potencia 200C del AUR. (A-C) Imágenes TEM e histograma de la frecuencia relativa de tamaños de nanopartículas para las muestras basadas en etanol y (D-G) para las muestras a base de agua; recuadro - datos EDX para los puntos marcados o el espectro de suma.

### 3.2. Investigaciones de espectroscopía Raman y aprendizaje profundo

Después de realizar los estudios TEM, se puede considerar una técnica rápida y no destructiva como la espectroscopía Raman para el análisis de las soluciones investigadas. Debido a los ensamblajes más grandes observados en TEM para las muestras basadas en agua

y considerando las peculiaridades Raman de las soluciones de agua y etanol, se aplicó la espectroscopía Raman solo a las soluciones basadas en agua. El objetivo fue investigar las transformaciones que aparecen en tres grupos/categorías: PW, UW y AUR. PW se emplea generalmente para la preparación de remedios homeopáticos, mientras que UW es una forma parcialmente purificada de agua; estos tipos de agua

poseen diferentes características. Aquí, se destaca la baja conductividad de las muestras de PW (0.7–0.88  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) y sus bajos niveles de iones ( $\text{NO}_3^- < 0.2$  ppm,  $\text{Al} < 3\text{--}5$  ppb, metales pesados totales 0.00682 ppm); además, las muestras de UW tienen mayor conductividad (196  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) así como mayores concentraciones de diferentes iones (nitrato, bicarbonato, sodio, etc.). Véase la sección de Materiales y Métodos para más detalles. La potenciación se aplicó a las muestras de PW, UW y AUR preparadas en tres días diferentes para obtener tres lotes de muestras potenciadas en las potencias 6C, 30C y 200C. PW y UW generalmente no se potencian para su comercialización; el procedimiento de potenciación se les aplicó solo para este estudio. Así, se analizaron 33 muestras mediante espectroscopía Raman. Cada muestra se analizó en 5 puntos para obtener datos representativos de las soluciones investigadas. Un total de 165 espectros Raman (rango 180–4000  $\text{cm}^{-1}$ ) fueron sometidos al estudio de clasificación. Los espectros Raman sin pretratamiento y pretratados con bg obtenidos durante este experimento, para diferentes niveles de potenciación (6C, 30C y 200C) de los tipos de muestras investigadas (PW, UW y AUR), se muestran en las Figs. S12–S17.

### 3.2.1. Clasificación de todas las clases con aprendizaje profundo utilizando el modelo GRU

Los resultados de la clasificación espectral Raman para las 11 clases diferentes obtenidos utilizando el modelo GRU entrenado se muestran en la Fig. 4; se consideraron tanto conjuntos de datos sin pretratamiento como pretratados con bg. La matriz de confusión se muestra para proporcionar un resumen del número de instancias en las que el modelo GRU predijo con precisión o erróneamente el resultado. El modelo demuestra una muy buena capacidad de reconocimiento al comparar las tres categorías investigadas; así, muestra gran eficiencia al discriminar entre las categorías AUR, PW y UW cuando se consideran los datos Raman sin pretratamiento (Fig. 4A). En este caso, se puede observar una precisión del 88 % (Tabla 1); este valor puede considerarse muy bueno, especialmente si se consideran las grandes similitudes entre las clases investigadas. Este valor, que es un poco menos del 90 %, representa principalmente el resultado de asignaciones incorrectas generadas para diferentes niveles de potenciación o muestras de referencia pertenecientes a la misma categoría; solo se han registrado 3 asignaciones incorrectas entre las tres clases investigadas: AUR, PW, UW (una muestra de AUR200C se asoció a UW200C y dos muestras de UW30C se asignaron a AUR6C y AUR200C, respectivamente). Así, para la categoría AUR, las otras tres asignaciones incorrectas se debieron a las

similitudes entre diferentes niveles de potenciación dentro del grupo. Se ha observado un comportamiento similar dentro de los grupos PW y UW. No hubo errores relacionados con la diferenciación de PW de las muestras AUR o UW. Dentro de los grupos PW y UW, se observó un reconocimiento correcto para el nivel de potencia 200C, mientras que, para los otros niveles de potenciación, se asignaron incorrectamente hasta 5 muestras (este máximo se alcanzó en la clase PW6C). Sin embargo, cuando se aplicó el modelo GRU al conjunto de datos pretratados con bg, los resultados mostraron una precisión de solo el 59 % (Fig. 4B y Tabla 1). Se obtuvieron resultados de clasificación incorrecta importantes dentro de los tres grupos investigados, pero también hubo algunas asignaciones incorrectas a muestras fuera del grupo correspondiente. Estos resultados muestran que la baja capacidad de reconocimiento del modelo se debe a la pérdida de información que ocurrió cuando se aplicó la sustracción de fondo a los datos Raman. Los grupos AUR y UW parecen ser los más afectados (Fig. 4B). La Tabla 1 presenta un análisis detallado de los valores de rendimiento del enfoque propuesto. La precisión, la recuperación y los valores  $f_1$  para cada clase se determinaron de manera independiente. Los resultados de los experimentos indicaron que las puntuaciones macro  $f_1$  para los dos conjuntos de datos fueron 0.88 y 0.59. Cabe destacar que las categorías PW, PW6C, PW30C y PW200C tienen tasas de reconocimiento estables en ambos conjuntos de datos. Cuando se consideran los valores de recuperación, el modelo tiende a subestimar la precisión de clasificación de las muestras UW30C. Se puede deducir de los hallazgos que, en general, el poder discriminativo de este modelo para los datos UW es algo limitado. Además, este trabajo investiga el uso de un enfoque bien conocido de aprendizaje automático, específicamente máquinas de vectores de soporte (SVM), para la categorización de datos Raman. En comparación con el método de aprendizaje profundo (GRU), la técnica tradicional de aprendizaje automático (SVM) arrojó las puntuaciones de precisión más bajas para los dos conjuntos de datos. Considerando estos resultados, se realizó una investigación más detallada, es decir, se empleó un enfoque de aumento de datos inteligente para aumentar el tamaño del conjunto de datos. Así, utilizando una estrategia de segmentación espectral, cada espectro Raman se dividió en segmentos más pequeños. Se encontró que las dimensiones del segmento eran  $1 \times 1024$ . Por ejemplo, cuando el tamaño de la muestra se decide que sea  $1 \times 12733$ , se adquieren un total de alrededor de 12 segmentos únicos. El conjunto de datos original contiene 15 instancias para una clase determinada. Al completar el procedimiento de segmentación, el conjunto de datos se redimensiona a  $1980 \times 1024$  y consta de 11 clases distintas. Así, el

tamaño de las muestras por clase se convierte en 180. Luego, el conjunto de datos se divide, asignando el 80 % para el entrenamiento y la porción restante para fines de prueba. Se aplicó la validación cruzada de cinco pliegues para medir el rendimiento de nuestro modelo GRU en los conjuntos de datos obtenidos por segmentación. Siguiendo este enfoque, se encontró que existe una relación directa entre el aumento del tamaño del segmento y la disminución del rendimiento. Los resultados experimentales presentados en la Fig. S18 y la Tabla S1, obtenidos al involucrar las muestras de los conjuntos de prueba, demuestran que nuestro modelo

GRU logra una alta puntuación de precisión del 99.45 % para datos sin pretratamiento y una puntuación de precisión perfecta del 100 % para datos pretratados con bg en las 11 clases. Incluso si se deben realizar investigaciones adicionales, es decir, involucrando un mayor número de muestras, antes de proponer la estrategia de segmentación espectral como la más apropiada para experimentos que contienen un gran número de clases, esta estrategia puede considerarse un valioso enfoque de aumento de datos para nuestro tipo de datos.

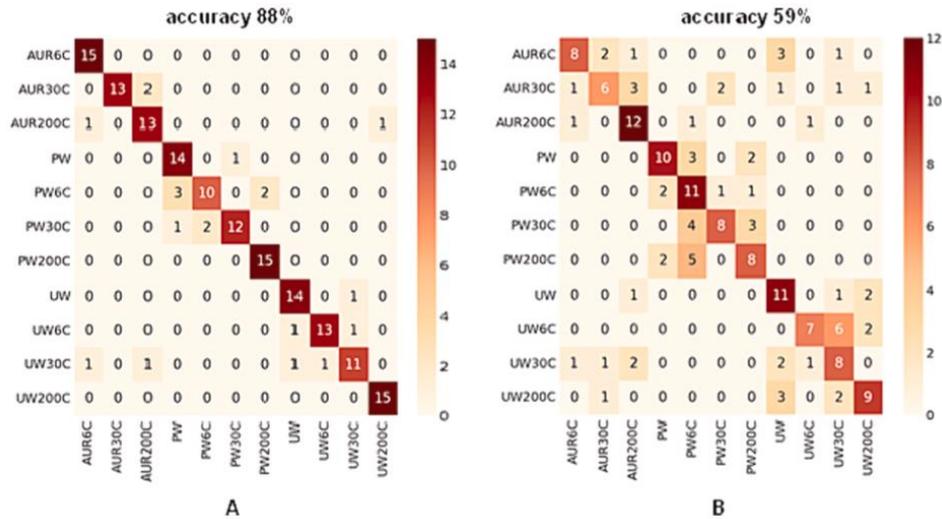


Fig. 4. Matriz de confusión del modelo GRU para (A) datos sin tratar y (B) datos tratados con bg de todas las categorías investigadas.

Tabla 1. Resultados de clasificación obtenidos con datos Raman sin tratar y con sustracción de la línea de base (bg-pretratados).

	GRU						SVM					
	unpretreated			bg-pretreated			unpretreated			bg-pretreated		
	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
	Accuracy: 88 %			Accuracy: 59 %			Accuracy: 61 %			Accuracy: 35 %		

### 3.2.2. Clasificación de potencias dentro de cada grupo utilizando el modelo GRU de aprendizaje profundo

La tasa de reconocimiento obtenida con el método DL dentro de cada categoría (AUR 6C, AUR 30C, AUR 200C, PW), (PW, PW 6C, PW 30C, PW 200C) y (UW, UW 6C, UW 30C, UW 200C), se analizó involucrando datos Raman sin pretratamiento y pretratados con bg, y los resultados se compararon en términos de valores de

rendimiento. La Fig. 5 ilustra los hallazgos de los experimentos después de aplicar una validación cruzada (CV) estratificada de 15 pliegues.

Para asignar muestras con fines de validación y entrenamiento, empleamos una técnica de división de 15 pliegues, donde se seleccionan 11 muestras para validación y las muestras restantes se designan para entrenamiento. Para el grupo AUR, la clase PW no potenciada se utilizó como referencia.

En el caso de AUR vs. PW, las matrices de confusión producidas demuestran que se obtuvieron precisiones del 98 % y 78 %, Fig. 5A,D. Los hallazgos mostraron precisiones del 90 % y 75 % para el grupo PW, Fig. 5B,E, mientras que se obtuvieron valores de precisión del 92 % y 68 % para el grupo UW, Fig. 5C,F. En general, los grupos PW6C y UW30C tienen un rendimiento bajo en comparación con las otras clases. Después de realizar un análisis general, es claro que el grupo AUR tiene la menor cantidad de clasificaciones incorrectas y que la mayoría de las clasificaciones erróneas ocurren debido al gran grado de semejanza entre las clases 6C y 30C.

3.2.3. Clasificación dentro del mismo nivel de potenciación utilizando el modelo GRU de aprendizaje profundo

Además, se analizó el rendimiento del DL para discriminar clases dentro del mismo nivel de potenciación basándose en sus espectros Raman (Fig. 6). Al categorizar los niveles de potenciación, consideramos cinco clases, incluidas las muestras potenciadas de AUR, PW y UW y las muestras no potenciadas de PW y UW como referencias. El análisis de los resultados mostró que para la potencia 6C, se obtuvieron valores de precisión del 99 % (sin pretratamiento) y 84 % (pretratado con bg) del modelo GRU. También se encontraron valores de precisión del 95 % (sin pretratamiento) y 83 % (pretratado con bg) para la potencia 30C. Para la potencia 200C, el modelo GRU arrojó valores de precisión del 96 % (sin pretratamiento) y 77 % (pretratado con bg). Así, el mejor rendimiento del modelo GRU se observó en el caso de soluciones de baja dilución (6C).

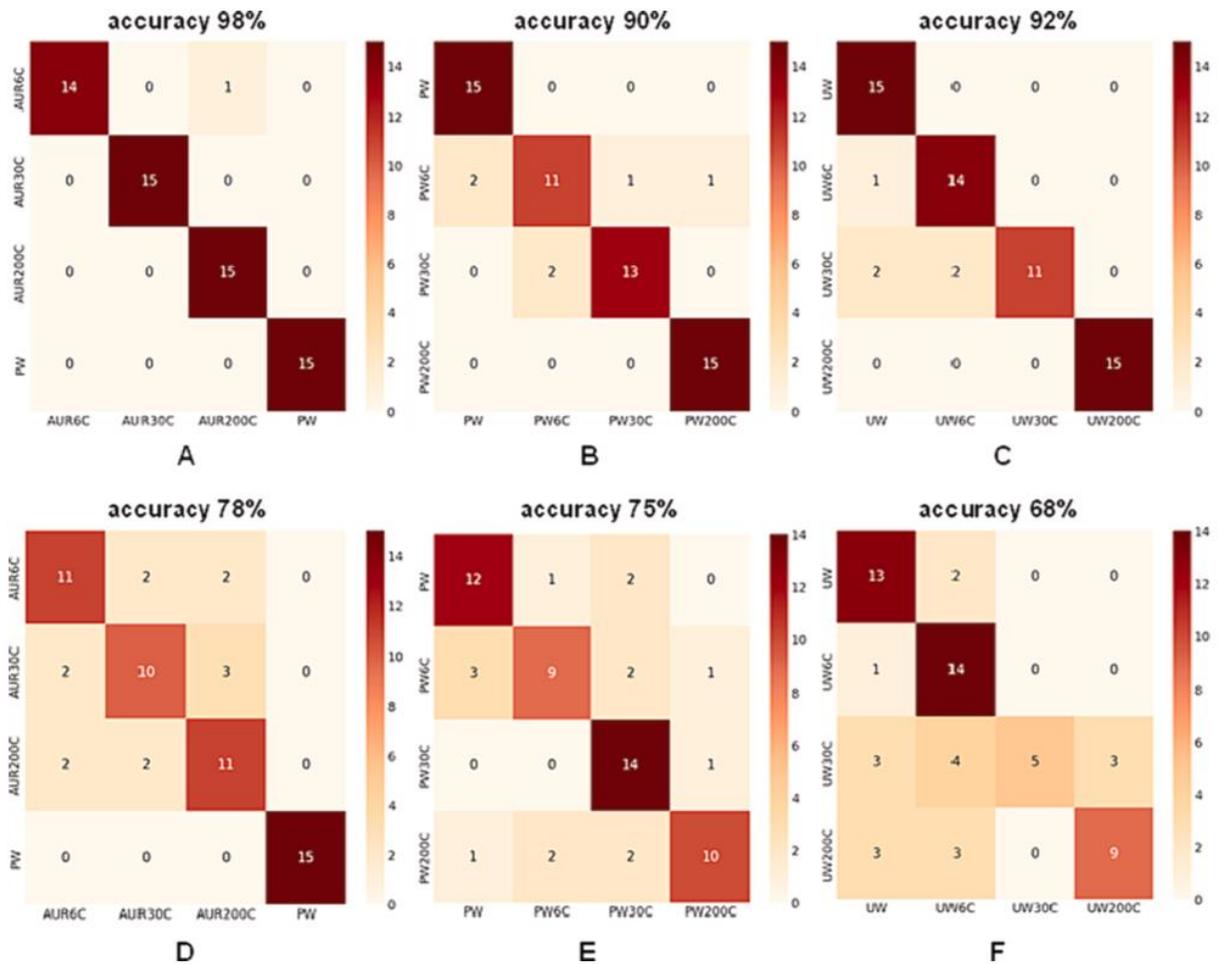
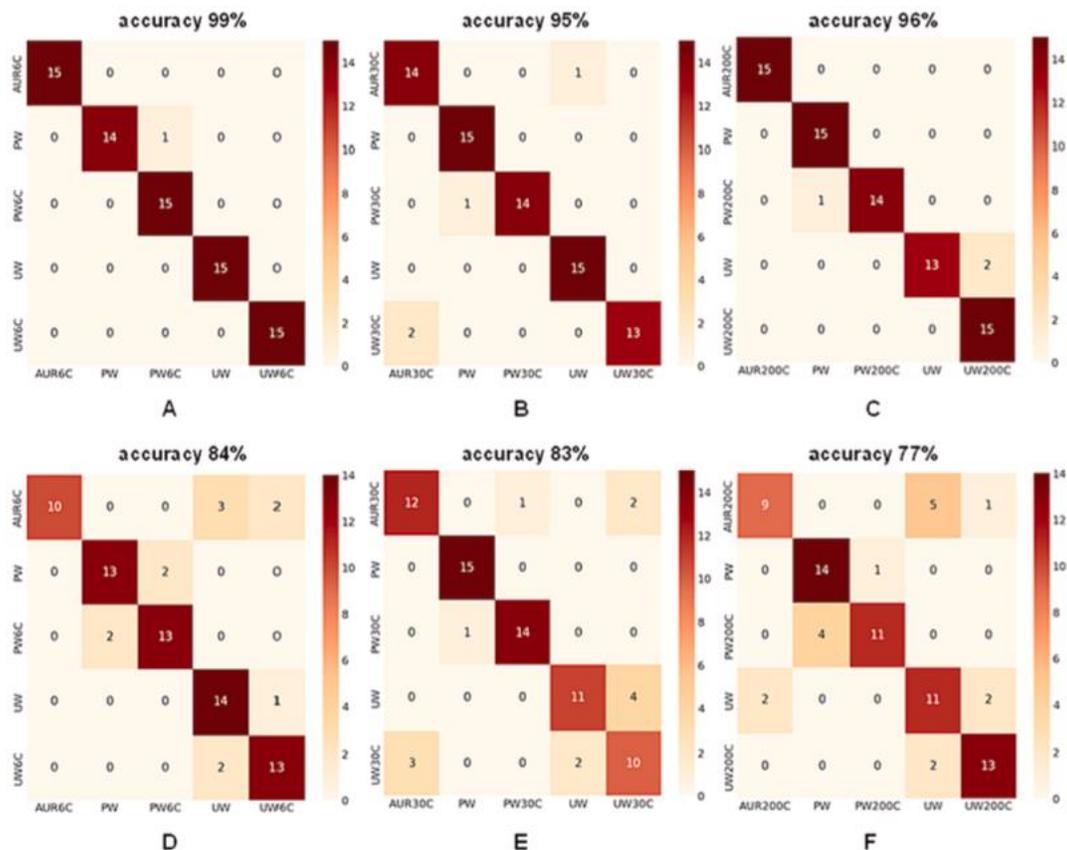


Fig. 5. Rendimiento del modelo de aprendizaje profundo para evaluar la discriminación dentro de cada grupo utilizando (A-B-C) datos sin tratar y (D-E-F) datos tratados con bg.



**Fig. 6.** Rendimiento del modelo de aprendizaje profundo para evaluar la discriminación dentro de cada nivel de potenciación utilizando (A-B-C) datos sin tratar y (D-E-F) datos tratados con bg.

#### 4. Discusión

La necesidad de encontrar técnicas confiables para la caracterización eficiente de ultra diluciones es bien conocida. En este estudio, mostramos que es posible utilizar un conjunto de métodos (TEM-EDX y espectroscopía Raman en combinación con DL) para la caracterización y diferenciación exitosa de soluciones altamente diluidas obtenidas después del tratamiento de potenciación. TEM-EDX puede usarse para evaluar la composición y morfología de cualquier solución coloidal. Mostramos aquí que esta técnica es eficiente incluso para soluciones altamente diluidas, permitiéndonos obtener información valiosa relacionada con cada nivel de potenciación y, de esta manera, discriminarlas creando una imagen que podría asociarse con cada nivel de potenciación.

Como observación general, la morfología de la solución AUR 6C parece ser similar a la de las soluciones coloidales de nanopartículas de oro habituales; el tamaño de las nanopartículas de oro depende de la naturaleza de las materias primas utilizadas en el proceso de síntesis. En el caso de las otras dos potencias de AUR, 30C y 200C, su diseño parece estar regido por la ley constructal que predice la

ingeniería estratégica de nuevas arquitecturas basadas en una ley de la física.

Si y O son los dos elementos omnipresentes en las muestras de AUR 30C, mientras que las nanopartículas aisladas que contienen impurezas como hierro (Fe), titanio (Ti), calcio (Ca), magnesio (Mg) y aluminio (Al) son visibles en la muestra E-AUR 30C, cuyos componentes son más pequeños. Estas impurezas provienen del solvente utilizado o podrían formarse durante el tratamiento de potenciación por disolución de los viales de vidrio (p. ej., Si o Ti). La razón por la que estas impurezas son tan evidentes en la potencia 30C puede atribuirse al tamaño de los componentes del remedio, que son más pequeños que los componentes de las otras dos potencias (6C y 200C). Además, se debe destacar el perfil filiforme observado en la muestra W-AUR 30C, la aparición de algunas estructuras basadas en carbono (C) en E-AUR 30C, y la presencia de oro en las dos muestras de potencia 30C.

Todas estas observaciones sugieren una organización diferente para las potencias 6C y 30C de AUR e indican la presencia de nanopartículas y ensamblajes de clústeres en las muestras de 30C. Así, la forma clara de nanopartícula de las impurezas y los ensamblajes filiformes/ de clústeres formados a partir de

pequeñas estructuras promueven la idea de que, al menos para AUR 30C, la organización observada no está relacionada principalmente con los sistemas nano particulados, sino más con grandes ensamblajes (clústeres) de pequeñas estructuras. Es probable que estos clústeres también contengan etanol y agua (en E-AUR) o moléculas de agua (en W-AUR), mientras que las impurezas, ya sean aisladas o vinculadas a estos grandes ensamblajes, aparecen como nanopartículas. Aunque se identificó oro en todas las muestras investigadas, parece disperso en la superficie de la rejilla en las imágenes de mapeo TEM-EDX.

Los resultados obtenidos para las muestras de AUR 200C sugieren una organización extendida de las moléculas de AUR 200C, indicando la existencia de estructuras estables y organizadas en un área más grande. Las impurezas están presentes como grandes ensamblajes; así, se pueden ver grandes impurezas (a escala micrométrica) como Si, Al, Fe y O vinculadas entre sí en los resultados de mapeo TEM-EDX. También se puede observar el perfil filiforme para las muestras W-AUR 200C, así como la aparición de algunas estructuras basadas en carbono (C) en E-AUR 200C, y la presencia de oro en los dos tipos de muestras de 200C investigadas.

Algunos de estos resultados están respaldados por la literatura; por ejemplo, la presencia de oro, incluso en potencias altas (30C y 200C) de AUR que están más allá del número de Avogadro, también se mostró en los trabajos de Chikramane et al. y Rajendran. En el trabajo de Chikramane et al., la composición elemental de las partículas TEM se identificó mediante difracción de electrones de área seleccionada (SAED) y se confirmó mediante análisis ICP-AES. El estudio de Rajendran destaca la idea de que las nanopartículas se encuentran principalmente a escala de puntos cuánticos en todas las soluciones; sus tamaños de partículas son aproximadamente similares a nuestros datos. Esta perspectiva nano particulada también está respaldada por nuestros hallazgos, pero además, nuestros resultados demuestran que la estructura de AUR combina nanopartículas y arreglos de clústeres compuestos de nanoestructuras más pequeñas o más grandes. Estos arreglos de clústeres son más evidentes para las diluciones altas que están más allá del número de Avogadro y están influenciados por la naturaleza del solvente y por el nivel de potenciación; cuanto mayor es la potencia, más ramificadas y grandes son las estructuras formadas. La extensión de esta organización en un área grande debería llevar a estructuras más estables y podría estar de acuerdo con la ley constructal de diseño y evolución en la naturaleza, como describen Vejan y Lorente.

Además del estudio TEM-EDX, investigamos si una metodología basada en espectroscopía Raman y DL es capaz de clasificar soluciones que no son

significativamente diferentes en estructura, como i) soluciones PW versus UW, que muestran diferencias sutiles ya que el UW utilizado en estos experimentos es esencialmente un agua parcialmente purificada utilizada en cosméticos, y ii) soluciones PW versus AUR, donde las diferencias se deben a la presencia de concentraciones muy bajas de oro en las muestras de AUR. Además, la complejidad y dinámica de las estructuras basadas en agua producen una respuesta en la región Raman investigada (especialmente en el rango de estiramiento OH), como lo demuestran Sun y varios otros autores.

Los resultados obtenidos para las tres situaciones investigadas (clasificación de todas las clases, clasificación de potencias dentro de cada grupo (AUR, PW y UW) o clasificación dentro del mismo nivel de potenciación (6C, 30C y 200C) demuestran que los enfoques DL pueden usarse para reconocer varias clases de manera fácil y efectiva. En el conjunto de datos con la línea de base eliminada (es decir, pretratado con bg), el modelo GRU no puede capturar la tendencia de los datos en su totalidad. Para lograr mejores resultados con datos pretratados con bg, empleamos normalización cuantificada. Además, en este caso, la técnica de normalización por lotes solo se aplicó después de la capa densa final del modelo. Se podría proponer un modelo con dos etapas de reconocimiento como una expansión del estudio actual. El primer modelo sería responsable de determinar el tipo de muestra, mientras que el segundo modelo podría separar las muestras de prueba en subclases dentro del tipo de muestra. Este procedimiento toma significativamente más tiempo, pero se cree que produce resultados superiores. Además, según los resultados obtenidos para el estudio de discriminación que involucra a las 11 clases y un enfoque de aumento de datos, el uso de un método de segmentación espectral puede considerarse una estrategia valiosa para aumentar la precisión de la predicción del modelo.

## 5. Conclusión

En general, al analizar los resultados obtenidos de TEM-EDX y la metodología basada en espectroscopía Raman y algoritmos DL, podemos argumentar que estos métodos pueden usarse con éxito para la caracterización de ultra diluciones. Este conjunto de técnicas reveló una modalidad que podría ser la base para discriminar diferentes remedios de acuerdo con la naturaleza de las sustancias iniciales utilizadas para preparar los remedios o podría permitir la diferenciación de muestras según su nivel de potenciación. Este enfoque permite el análisis de las soluciones altamente diluidas a una escala mucho mayor de lo que era posible en el pasado.

## Declaración de contribución a la autoría de CRediT

**Camelia Berghian-Grosan:** Redacción - revisión y edición, Redacción - borrador original, Supervisión, Metodología, Investigación, Curación de datos, Conceptualización. **Sahin Isik:** Redacción - revisión y edición, Redacción - borrador original, Software, Metodología. **Alin Sebastian Porav:** Redacción - revisión y edición, borrador original, Metodología, Investigación. **Ilknur Dag:** Redacción - revisión y edición, Redacción - borrador original, Supervisión, Metodología. **Kursad Osman Ay:** Redacción - revisión y edición, Redacción - borrador original, Metodología, Investigación. **George Vithoulkas:** Redacción - revisión y edición, Redacción - borrador original, Metodología, Conceptualización.

## Declaración de intereses

Camelia Berghian-Grosan y George Vithoulkas informan que los gastos de publicación de este artículo fueron sufragados por la Academia Internacional de Homeopatía Clásica. George Vithoulkas declara una relación con la Academia Internacional de Homeopatía Clásica que incluye pertenencia a la junta directiva. Los demás autores declaran que no tienen intereses financieros en competencia ni relaciones personales que pudieran haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

## Disponibilidad de los datos

Los datos estarán disponibles previa solicitud.

## Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Academia Internacional de Homeopatía Clásica (I.A.C.H.). Alonissos (Grecia) por el apoyo para esta investigación y al Dr. Drosos Kourounis por sus sugerencias y correcciones que mejoraron considerablemente la calidad de este manuscrito. Un agradecimiento especial a Korres Pharmacy y al Sr. George Korres (Grecia, [www.korres.com](http://www.korres.com)) por la preparación de las soluciones homeopáticas.

## Apéndice A. Material suplementario

Los datos complementarios de este artículo pueden consultarse en línea en <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124537>.

## Referencias

[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 homeopathic therapeutics*, F.E. Boericke, Philadelphia, 1889.

[4] J.T. Kent, *Lectures on Homoeopathic Materia Medica*, reprint, B. Jain Publications, 2005.

[5] G. Vithoulkas, *Materia Medica Viva 1-3*, Homeopathic Book Publishers, London, 1995.

[6] G. Vithoulkas, *Materia Medica Viva 4-13*, International Academy of Classical Homeopathy, Alonissos, 1997-2021.

[7] P. Nandy, A review of basic research on homeopathy 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. Olioso, 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. Vithoulkas, P. Garzonis, C. Tavouxioglou, A working hypothesis for homeopathic 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. Miadonna, 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.
- C. Berghian-Grosan et al. *Journal of Molecular Liquids* 401 (2024) 124537
- [36] J.F. Diez-Pastor, S.E. Jorge-Villar, A. Arnaiz-González, C.I. García-Osorio, Y. Díaz-Acha, 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 Gavón, *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 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.