

Analiza diluțiilor ultra-înalte: explorarea efectelor potențării prin microscopie electronică, spectroscopie Raman și deep learning

²Camelia Berghian-Grosan^a, Sahin Isik^b, Alin Sebastian Porav^a, Ilknur Dag^{c,d}, Kursad Osman Ay^c, George Vithoukcas^c

^aInstitutul Național de Cercetare și Dezvoltare în Tehnologii Izotopice și Moleculare, Cluj-Napoca 400293, Romania

^bDepartamentul de Inginerie Informatică, Universitatea Eskisehir Osmangazi, Eskiehir 26480, Turcia

^cLaboratorul Central de Cercetare - Centrul de Cercetare și Aplicare, Universitatea Eskisehir Osmangazi, Eskiehir 26480, Turcia

^dLiceul profesional de servicii sanitare, Universitatea Eskisehir Osmangazi, Eskiehir 26480, Turcia

^eUniversitatea Egeea, Mytilene 8110, Grecia

Cuvinte cheie:

Aurum metallicum, diluții ultra-înalte, potențare, ansambluri de clustere, inteligență artificială, date Raman.

Rezumat:

De-a lungul anilor, subiectul diluțiilor ultra-înalte s-a aflat în dezbateri continue, în principal din cauza faptului că posibilitățile de analiză a acestor soluții atât de diluate sunt limitate. În acest context, pentru a evalua caracteristicile morfologice ale soluțiilor apoase și etanolice foarte diluate de aur, au fost efectuate analize cu ajutorul microscopiei electronice de transmisie (TEM); fiecare tip de soluție a fost analizat în trei nivele de potență (6C, 30C și 200 C). În plus, s-a utilizat spectroscopia Raman și s-a apelat și la algoritmi de învățare profundă (DL – deep learning) pentru analiza celor trei niveluri de potențare a apei purificate, a apei nepurificate și a soluțiilor de aur în apă purificată. Au fost analizate trei loturi din fiecare categorie luată în considerare, iar capacitatea de discriminare între toate clasele investigate, între potențele din cadrul fiecărui grup sau între clasele din cadrul aceleiași nivel de potențare a fost prezentată și discutată în corelație cu rezultatele TEM. TEM a evidențiat forme distincte de organizare pentru cele trei niveluri de potențare, în timp ce modelul GRU (gated recurrent unit) a arătat o acuratețe mare (88 %) pentru discriminarea tuturor claselor, o acuratețe de peste 90 % pentru a distinge probele din cadrul fiecărui grup și o acuratețe de peste 95 % pentru clasificarea în cadrul aceleiași nivel de potențare când au fost utilizate spectre Raman netratate. Astfel, această suită de metode (TEM-EDX și spectroscopia Raman în combinație cu DL) poate fi utilizată cu succes pentru caracterizarea și diferențierea soluțiilor foarte diluate rezultate după tratamentul de potențare. În plus, având în vedere rezultatele obținute în urma studiului de discriminare care implică toate cele 11 clase și o abordare de creștere a cantității datelor, metoda de segmentare spectrală poate fi considerată o strategie valoroasă pentru creșterea acurateții de predicție a modelului.

1. Introducere

Potențarea este un proces ce implică diluții și sucusiuni (agitări viguroase) succesive; aceasta a fost introdusă pentru prima dată de medicul german Hahnemann care a observat că soluțiile din substanțe ce au fost supuse acestui proces au un efect biologic – cu evidențe terapeutice [1]. Până în prezent, au fost folosite

¹ <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124537>

Primit la 22 ianuarie 2024; primit în formă revizuită la 17 martie 2024; acceptat la 20 Martie 2024.

Disponibil online la 21 martie 2024

0167-7322© 2024 Autorii. Publicat de Elsevier B.V. Aceste este un articol cu acces deschis sub licența CC BT-NC

(<http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0>)

² Adrese de e-mail: camelia.grosan@itim-cj.ro (C. Berghian-Grosan), george@vithoukcas.com (G. Vithoukcas)

numeroase remedii homeopate, foarte bine documentate [2-6]; acestea sunt derivate dintr-o mare varietate de substanțe care sunt supuse unei potențări pentru a obține proprietățile lor vindecătoare. Câteva perspective pătrunzătoare au încercat să explice acțiunea remediilor homeopate [7-11]. Impactul succusiunii (agitare viguroasă) asupra unor preparate farmaceutice, cum ar fi Echinacea 10^{-2} , Baptisia 10^{-4} , Luffa⁻⁴ și Spongia⁻⁶, a fost recent evidențiat cu ajutorul evaporării picăturilor și al analizei statistice; probele s-au preparat conform prevederilor Farmacopeei Europene pentru medicamente homeopate, iar autorii au aplicat 0, 10 sau 100 lovături de sucusiune. Rezultatele au demonstrat diferențe semnificative pentru toate preparatele investigate [12]. În plus efectele șocurilor mecanice (ex. agitare, cădere în picătură) asupra soluțiilor de proteine sunt bine cunoscute și în unele studii au fost analizate și propuse măsuri de atenuare a acestor efecte [13,14]. Cu toate acestea, pentru homeopatie, agitarea simultană cu diluția reprezintă un instrument esențial pentru prepararea remedului.

O preocupare majoră în ceea ce privește soluțiile potențate în diluții înalte (30C, 200C etc) dincolo de numărul lui Avogadro, care stabilește limita de diluție (12C) dincolo de care substanța inițială nu mai poate fi prezentă, este că nu este de așteptat ca materialul de plecare să fie găsit nici în cea mai mică cantitate [15]. Cu toate acestea, într-un studiu bazat pe remedii obținute din metale, Chikramane et al. [10] a demonstrat prezența materialelor de plecare, sub formă de nanoparticule, în diluțiile extreme de 30C și 200C prin microscopie electronică de transmisie (TEM), difracție electronică și spectroscopie de emisie atomică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-AES). De-a lungul anilor au fost utilizate diferite tehnici pentru caracterizarea remediilor preparate homeopatic, evidențiind existența unor structuri specifice chiar și în remediile foarte diluate [16-24]. Cu toate acestea, în cadrul comunității științifice, este binecunoscut faptul că experimentul Benveniste [25], la scurt timp după publicarea rezultatelor sale, a fost dovedit fals de către o comisie științifică trimisă de revista Nature în laboratorul autorului, după cum explică George Vithoulkas în lucrarea sa, "The controversy over the memory of the water" (Controversa privind memoria apei) [26].

Apa este un solvent deosebit ce joacă un rol important în procesele biologice și chimice [27]. Prin urmare, înțelegerea proprietăților anormale ale apei lichide a fost de un interes continuu și au fost efectuate numeroase studii experimentale și teoretice pentru a înțelege structura sa [28,29]. Cu toate acestea, structura și dinamica apei continuă să fie dezbătute [30]. Sensibilitatea la diferite medii locale a modului de elongație a legăturii OH permite utilizarea spectroscopiei vibraționale în studiul structurii și dinamicii apei lichide [28]. Investigarea apei lichide prin spectroscopie în infraroșu și Raman relevă peak-uri largi în regiunea de elongație OH, sugerând influențe subiacente multiple (din partea diverselor specii induse de diferite aranjamente locale ale legăturilor de hidrogen), în timp ce în spectrele de gheață pot fi observate clar peak-uri distincte [31]. În 2009, Sun [32] a analizat apa lichidă în condiții ambientale cu ajutorul spectroscopiei Raman și a propus deconvoluția regiunii de elongație OH în cinci subbenzi. Cu toate acestea, din cauza complexității apei și a diluțiilor mari ale soluțiilor investigate, o astfel de analiză este o sarcină foarte dificilă. Pentru a aborda aceste dificultăți, tehnicile chemometrice și, mai recent, modelele de învățare automată (ML - machine learning) au fost aplicate semnalelor Raman pentru analiza și învățarea datelor [33]. Algoritmii ML câștigă în prezent o popularitate din ce în ce mai mare în aplicațiile de clasificare [34,35]. Recent, metodele algoritmilor tradiționali și de deep learning au fost aplicate cu succes pentru a discrimina spectrele Raman ale diferitelor materiale complexe (de exemplu, minerale) sau pentru a clasifica date spectroscopice de dimensiuni mari [36-38].

Învățarea profundă (DL – deep learning) este un subdomeniu al ML (machine learning) care este substanțial mai robust decât metodele bazate pe ingineria caracteristicilor utilizate în trecut. Abordările DL prezintă numeroase avantaje, printre care se numără faptul că sunt eficiente din punct de vedere al timpului, nu necesită construirea de caracteristici și dau rezultate superioare. Rețelele neuronale artificiale, cunoscute adesea sub numele de ANNs (Artificial Neural Networks), sunt precursorii tehnicilor de DL. ANNs constau dintr-un strat de intrare, unul sau mai multe niveluri (straturi) intermediare și un strat de ieșire. Aceste abordări sunt adesea pregătite prin învățare supravegheată, ceea ce înseamnă că în procesul de pregătire se utilizează pentru un set de date etichete predefinite. Rețeaua neuronală convoluțională (CNN - convolutional neural network)[39], una dintre cele mai reprezentative rețele de DL, este un tip de rețea neuronală de tip feedback forward (reacție propagată înainte) care utilizează operații convoluționale și un număr foarte mare de filtre. Există mai multe tipuri diferite de algoritmi de învățare bazată pe convoluție care pot fi utilizate în funcție de sarcina dorită. Pentru aplicații bazate pe imagini, se utilizează de obicei modelele CNN 2-D. Pentru a gestiona

sarcinile de predicție sau clasificare bazate pe serii temporale sunt utilizate modelele GRU (gated recurrent unit) [40-41] și CNN 1-D. Motivul principal este că modelele recurente au capacitatea potențială de a-și păstra relațiile între datele secvențiale pe termen lung. Aceste abordări oferă un ajutor substanțial în rezolvarea problemei gradientului de dispariție [42].

Studiul de față investighează organizarea structurală a soluțiilor etanolice sau apoase de aur, un remediu homeopat denumit Aurum metallicum (AUR). Trei soluții înalt diluate (6C, 30C și 200 C) de AUR au fost supuse analizei TEM în două laboratoare independente locat în România și Turcia. Organizarea diferită a acestor soluții a fost confirmată de ambele laboratoare. Selectarea acestor diluții centezimale a fost motivată de nevoia de a investiga soluții ce conțin cantități reduse din substanța inițială, chiar dincolo de numărul lui Avogadro (de exemplu ultimele două diluții investigate). Au fost, de asemenea, obținute spectre Raman pentru soluții potențate diferite pe bază de apă (apă purificată (PW), apă nepurificată (UW) și soluție de aur pe bază de PW (AUR)), iar aceste spectre au fost procesate cu ajutorul algoritmilor DL pentru a investiga capacitatea modelelor GRU de a discrimina între toate aceste soluții și de a clasifica probele în cadrul categoriilor investigate (AUR, PW și UW) sau în cadrul celor trei niveluri de potențare (6C, 30C și 200C). DL a fost utilizată pentru a evalua eficiența sa pentru clasificarea spectrelor Raman. Se presupune că valorile spectrale Raman sunt valori temporale; prin urmare, am aplicat o rețea neuronală recurentă. Am efectuat experimente cu modelul GRU, deoarece acesta rezolvă atât problema gradientului de dispariție, cât și cea a vitezei. Astfel, am testat capacitatea acestei abordări de clasificare de a fi utilizată, în combinație cu spectroscopia Raman, pentru analiza soluțiilor pe bază de apă obținute după potențare. Rezultatele noastre ne-au permis să demonstrăm că această suită de metode (TEM-EDX și spectroscopia Raman în combinație cu DL) poate fi utilizată cu succes pentru caracterizarea și diferențierea soluțiilor foarte diluate rezultate după tratamentul de potențare.

2. Material și metodă

2.1 Materiale

Toate soluțiile investigate au fost preparate de compania Korres (Atena, Grecia), o companie certificată Agenția Națională a Medicamentului (EOF – Grecia). Aceste soluții au fost produse în conformitate cu prevederile Farmacopeei Homeopatice Germane (GHP), respectând ghidul de bună practică de fabricație farmaceutică (GMP) [43] și considerând procedurile Farmacopeei Europene pentru testele de conformitate, cu câteva excepții clar indicate. Și anume, excepțiile se referă la solvenții utilizați în etapa finală a procesului de preparare: etanol 50 % v/v pentru soluțiile pe bază de etanol și apă purificată pentru soluțiile pe bază de apă. Funcție de materialul de start, soluțiile au fost împărțite în trei grupuri: apă purificată (PW), apă nepurificată (UW) și Aurum metallicum (AUR). Pentru fiecare categorie, au fost preparate trei nivele de potență (6C, 30C, și 200 C), câte trei serii pentru fiecare nivel de potență preparate în zile diferite. Notația C este asociată diluției centezimale și înseamnă 1 parte de soluție concentrată/soluție potențată anterior la 99 părți eluant (masă/masă).

Pentru probele PW și UW, obiectivul a fost de a pregăti soluții potențate care sunt analoge soluțiilor medicamentoase din toate punctele de vedere, cu excepția absenței unui ingredient medicamentos activ. În general, la prepararea remediilor homeopatice este utilizată PW (în acord cu prevederile Farmacopeei Europene – Ph. Eur), în timp ce UW este parțial purificată. Tipurile de apă utilizate în acest studiu au avut următoarele caracteristici, după cum au fost ele menționate de compania Korres: PW – conductivitate 0.7-0.88 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH 6.4 – 6.8, $\text{NO}_3^- < 0.2$ ppm și ioni de metale, Al < 3-5 ppb, As < 0.005 ppm, Pb 0.00032 ppm, Cd < 0.001 ppm, Hg < 0.0005 ppm (total metale grele 0.00682 ppm, limita < 0.1 ppm); : UW – conductivitate 196 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH 7.8, HCO_3^- 66 ppm, Cl^- 22ppm, NO_3^- 9.8 ppm Na^+ 15 ppm, Ca^{2+} 10 ppm, Mg^{2+} 8.8 ppm, CO_2 9.7 ppm. Astfel, apa purificată Ph. Eur. și, respectiv, apa nepurificată au fost utilizate ca material de plecare. Apa purificată Ph. Eur. a fost utilizată, de asemenea, în procesul de diluție și, datorită scopurilor experimentale specifice, în procesele de preparare a soluțiilor 30C și 200C de PW și UW.

Pentru probele din grupul AUR a fost folosită pentru început o metodă bazată pe triturarea Aurum metallicum cu lactoză monohidrat, ca vehicul, până la nivelul 4C; apoi, pentru a obține potența lichidă 6C, protocolul a prevăzut utilizarea de apă purificată (de calitate conformă cu Ph. Eur.) pentru prepararea potenței 5C și etanol 30 % (m/m) pentru prepararea diluției lichide 6C. Începând de la 6C și până la 29C și, în consecință,

până la C199, în procesul de preparare s-a utilizat apa purificată de calitate Ph. Eur. Soluțiile finale de potențe 30C și 200C au fost preparate cu etanol 50 % (v/v) pentru soluțiile AUR pe bază de etanol. Datorită scopurilor experimentale specifice, în procesele de preparare a soluțiilor AUR pe bază de apă 30C și 200C a fost utilizată apa purificată Ph. Eur.

2.1.1. Microscopia electronica de transmisie

Pentru studiile cu ajutorul TEM au fost folosite 2 tipuri de probe de AUR; primul tip, AUR preparat în soluție etanolică 50%, a fost analizat în România și a fost denumit E-AUR, în timp ce al doilea tip a fost preparat numai în apă purificată (PW) și a analizat în Turcia (denumit W-AUR). Pentru ambele tipuri de AUR, au fost analizate trei probe potențate și anume 6C, 30C și 200C.

2.1.2. Investigațiile Raman

Pentru investigațiile Raman, au fost utilizate trei tipuri de soluții: apă purificată (PW), apă nepurificată (UW) și AUR. În plus, pentru grupele PW și UW am considerat probele nepotențate (ca probe de referință preparate din tipurile de apă utilizate pentru procesul de potențare) și trei tipuri de probe de apă potențate (6C, 30C și 200C); pentru fiecare tip de probă apoasă potențată au fost preparate 3 serii în trei zile diferite. Pentru probele din categoria AUR, au fost analizate numai soluții apoase potențate. Astfel au fost considerate în total 12 probe pentru PW, 12 probe pentru UW și 9 probe pentru AUR.

2.2. Metode

2.2.1. Procedurile TEM și EDX din Romania

Caracterizarea structurală și morfologică a probelor de AUR a fost realizată cu ajutorul unui microscop electronic cu transmisie și scanare (STEM) Hitachi HD-2700 echipat cu un detector de electroni secundari (SE), un detector de electroni transmiși (TE) (Hitachi High Tech., Japonia) și un tun de emisie de câmp rece proiectat pentru imagistică de înaltă rezoluție (HRTEM) cu o rezoluție de 0,144 nm. Grilajele TEM acoperite cu carbon au fost tratate cu 6 μ l din soluțiile potențate de AUR, care au fost în prealabil agitate prin sucusiune de 10 ori pentru omogenizare. După 1-2 minute, excesul de lichid a fost tamponat cu hârtie de filtru Whatman gradul 1, iar grilaje au fost lăsate să se usuce la aer. Probele au fost analizate cu ajutorul sistemului STEM operat la 200 kV. Pentru investigațiile EDX a fost utilizat un sistem dual EDX format dintr-un detector cu drift de siliciu (SDD) X-Max N100TLE (Oxford Instruments).

2.2.2. Procedurile TEM și EDX din Turcia

Imaginile prin TEM a trei probe potențate de AUR au fost obținute cu ajutorul unui TEM Hitachi HT 7800 operat la voltaj de accelerare de 100 kV. După ce fiecare probă a fost agitată de 10 ori, a fost aplicată o picătură pe grilajul acoperit cu carbon și lăsat să se usuce la aer în mediu curat. Analiza EDX a probelor a fost efectuată cu ajutorul unui X-MaxN (Oxford Instruments) conectat la același dispozitiv TEM pentru a confirma prezența aurului.

Histogramele realizate atât pentru imaginile TEM românești, cât și pentru cele turcești au fost realizate pe baza datelor obținute cu software-ul ImageJ (NIH, SUA).

2.2.3. Spectroscopia Raman

Spectrele Raman au fost înregistrate pe un spectrometru Raman NRS-3300 (Jasco, Japonia) echipat cu un detector CCD (charge-coupled device), folosind o excitație laser de 514,5 nm (lumină verde). Soluțiile au fost analizate în tuburi capilare de sticlă (Marienfeld, Germania) cu un diametru de 1,5-1,6 mm. Pentru înregistrarea spectrelor Raman de la aproximativ 72 cm^{-1} la 4020 cm^{-1} , s-a utilizat un obiectiv Olympus UMPLFL 20X, un grilaj (rețea) de 600 l/mm, o fantă de 0,1 \times 6 mm, un timp de expunere de 120 s și trei scanări. Pentru calibrarea spectrometrului s-a folosit peak-ul de la 521 cm^{-1} corespunzător Si. Datele brute și zgomotele de fond nu au fost denaturate sau netezite, iar valorile aberante nu au fost eliminate din setul de date. Preprocesarea datelor a implicat două etape principale și a fost realizată cu Spectra Manager (JASCO) și OriginPro 2023 (OriginLab Corporation). Prima etapă de pretratare a datelor a selectat un interval de numere de undă cuprins între 180 și

4 000 cm^{-1} și a limitat numărul de caracteristici la mai puțin de 13 000 prin aplicarea unei metode spline de ordinul 3 cu un pas al datelor de 0,3. Aceste date au fost ulterior normalizate la [0,1] și considerate pentru analiza DL ca date Raman ne-pretratate. A doua etapă a implicat un proces de eliminare a semnalului liniei de bază (bg) care a fost aplicat în OriginPro la datele obținute, înainte de normalizare, în prima etapă. Pentru a aplica procesul de eliminare a bg, au fost parcurse următoarele etape: modul de linie de bază definit de utilizator, metoda derivatei a 2-a (zerouri) pentru detectarea punctului de ancorare, aderarea la spectru, metoda de interpolare a liniilor și același număr de puncte de linie de bază ca și datele de intrare [44]. Datele obținute au fost ulterior normalizate la [0,1] înainte de a fi utilizate pentru a construi seturile de date tratate pentru eliminarea bg pentru studiul DL.

2.2.4. Invățarea profundă (Deep learning)

Studiile DL au fost efectuate cu ajutorul limbajului de programare Python și Colab Pro, care oferă un mediu de calcul accelerat. Modelul GRU a fost construit și antrenat folosind biblioteca Keras 2.12.0. GPU Colab Tesla T4 a fost utilizat pentru antrenarea modelului cu o dimensiune mare a lotului. Tesla T4 are un total de 2560 de nuclee CUDA, precum și o capacitate de calcul de 3.7, 15 GB de memorie și GDDR6 VRAM. În plus, pachetul Sklearn 1.2.2 a fost utilizat pentru a analiza și explica rezultatele obținute. Mai multe detalii referitoare la protocolul pentru studiile DL sunt prezentate în secțiunea Material suplimentar și în figurile S1 și S2.

3. Rezultate

Pentru a determina capacitatea metodei propuse de noi pentru caracterizarea diferitelor soluții și potențe, am urmărit mai întâi să determinăm proprietățile probelor prin analiza TEM.

3.1. Analiza TEM

TEM este un instrument valoros care furnizează date fundamentale despre organizarea nanomaterialelor; aceste cunoștințe sunt foarte importante pentru înțelegerea și dezvoltarea în știința materialelor, precum și pentru domeniile care utilizează soluții foarte diluate care sunt, de asemenea, compuse din nanostructuri.

3.1.1. *Aurum metallicum 6C*

Figura 1 prezintă câteva imagini TEM obținute cu două instrumente diferite (a se vedea secțiunea Metode) pentru potența 6C a AUR. Au fost utilizate două medii diferite pentru pregătirea probelor - primul mediu a fost o soluție de etanol 50% v/v, care a fost utilizată pentru probele de AUR analizate în România (E-AUR 6C). Al doilea mediu a fost apa purificată, care a fost utilizată pentru probele analizate în Turcia (W-AUR 6C). În ciuda diferențelor de bază ale solvenților, imaginile TEM obținute sunt destul de similare în ceea ce privește forma nanoparticulelor. Cu toate acestea, dimensiunea nanoparticulelor depinde de tipul de solvent. Acest lucru este relevant în histogrammele celor două probe, indicând nanoparticule mai mici pentru E-AUR 6C decât pentru W-AUR 6C (figurile 1C și G), cel mai probabil pentru că etanolul este mai eficient ca agent stabilizator decât apa. Datele EDX (inserțiile din figura 1 și figurile S3 și S4) indică procente comparabile de aur (Au) în ambele probe și prezența siliciului (Si) și a oxigenului (O) (cuprul (Cu) provine din grilaj).

3.1.2. *Aurum metallicum 30C*

În continuare a fost investigată potența 30C a AUR; figura 2 și figurile S5-S8 prezintă imaginile TEM, datele EDX și rezultatele cartografierii TEM-EDX pentru această potență. Aici, merită să menționăm asemănările dintre cele două probe, E-AUR 30C și W-AUR 30C, în ceea ce privește forma nanostructurii și apariția impurităților.

Ca și în cazul precedent, potența 6C, dimensiunea nanoparticulelor/nanostructurilor de potență 30C tinde să fie mai mică pentru E-AUR decât pentru W-AUR (figurile 2C și G); acest comportament se explică prin capacitatea etanolului de a acționa ca un agent stabilizator eficient. Mai mult, histogrammele din figurile 1 și 2 indică nanostructuri mai mici în E-AUR 30C decât în E-AUR 6C și o scădere semnificativă a dimensiunii de peste

150 nm în raport cu probele pe bază de apă; aceste structuri mari se văd clar în W-AUR 6C, dar sunt vizibile doar în urme în proba W-AUR 30C.

Această schimbare semnificativă între profilurile celor două potențe, 6C și 30C, apare după procesul de potențare, care implică mai multe diluții și sucusiuni succesive.

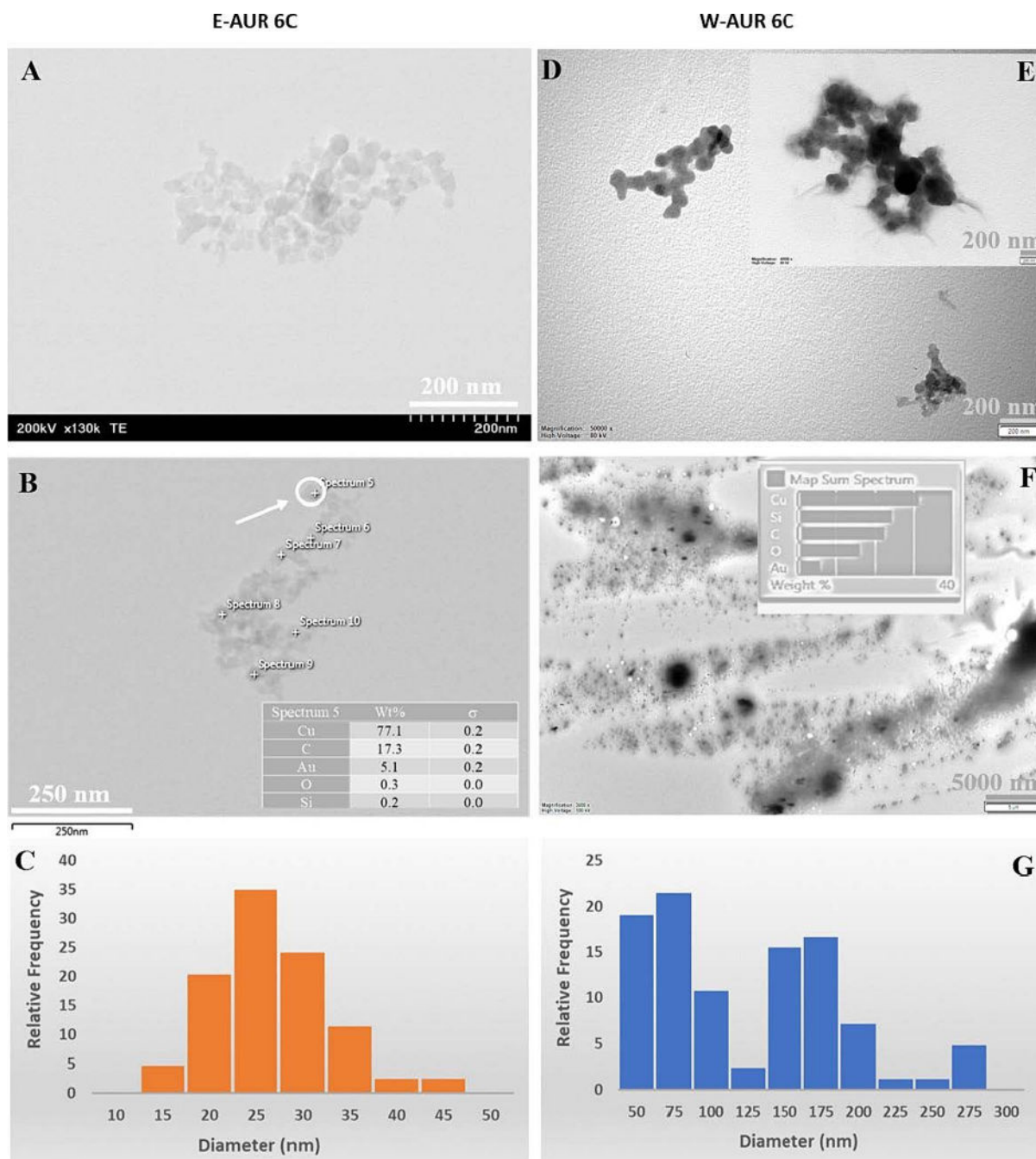


Figura 1. Date TEM pentru potența 6C a AUR. (A-C) Imagini TEM și histograma frecvenței relative a dimensiunilor nanoparticulelor pentru probele AUR pe bază de etanol și (D-G) pentru probele pe bază de apă; inserție - date EDX pentru punctele marcate sau spectrul sumativ.

3.1.3. Aurum metallicum 200C

Caracteristicile potenței 200C sunt ilustrate în figura 3 și figurile S9-S11 și sunt obținute prin analiza a două probe (E-AUR 200C – preparată folosind o soluție apoasă de etanol 50% v/v și W-AUR 200C – preparată doar cu apă purificată).

Tendința generală observată pentru potențele 6C și 30C este prezentă și în acest caz; mai precis dimensiunea nanostructurilor din proba E-AUR e mai mică decât a celor din W-AUR 200C, așa cum se observă în histogramele prezentate în figura 3. În plus, în ambele probe 200C nanoparticulele sunt mai mari decât

nanoparticulele observate la potența 30C și cu dimensiuni și formă foarte diferite de nanoparticulele din potența 6C (figurile 1-3).

O organizare distinctă și o lipsă totală de impurități în interiorul unor ansambluri de clustere AUR 200C sunt evidente în figura 3B. În plus, ambele probe AUR 200C prezintă un mod de asamblare preferențial ramificat (figurile 3A și D), iar prezența unor cantități mici de impurități, cum ar fi Si și Fe, în aceste clustere este demonstrată de datele EDX prezentate în inserția din figura 3 și figurile S9 și S11B.

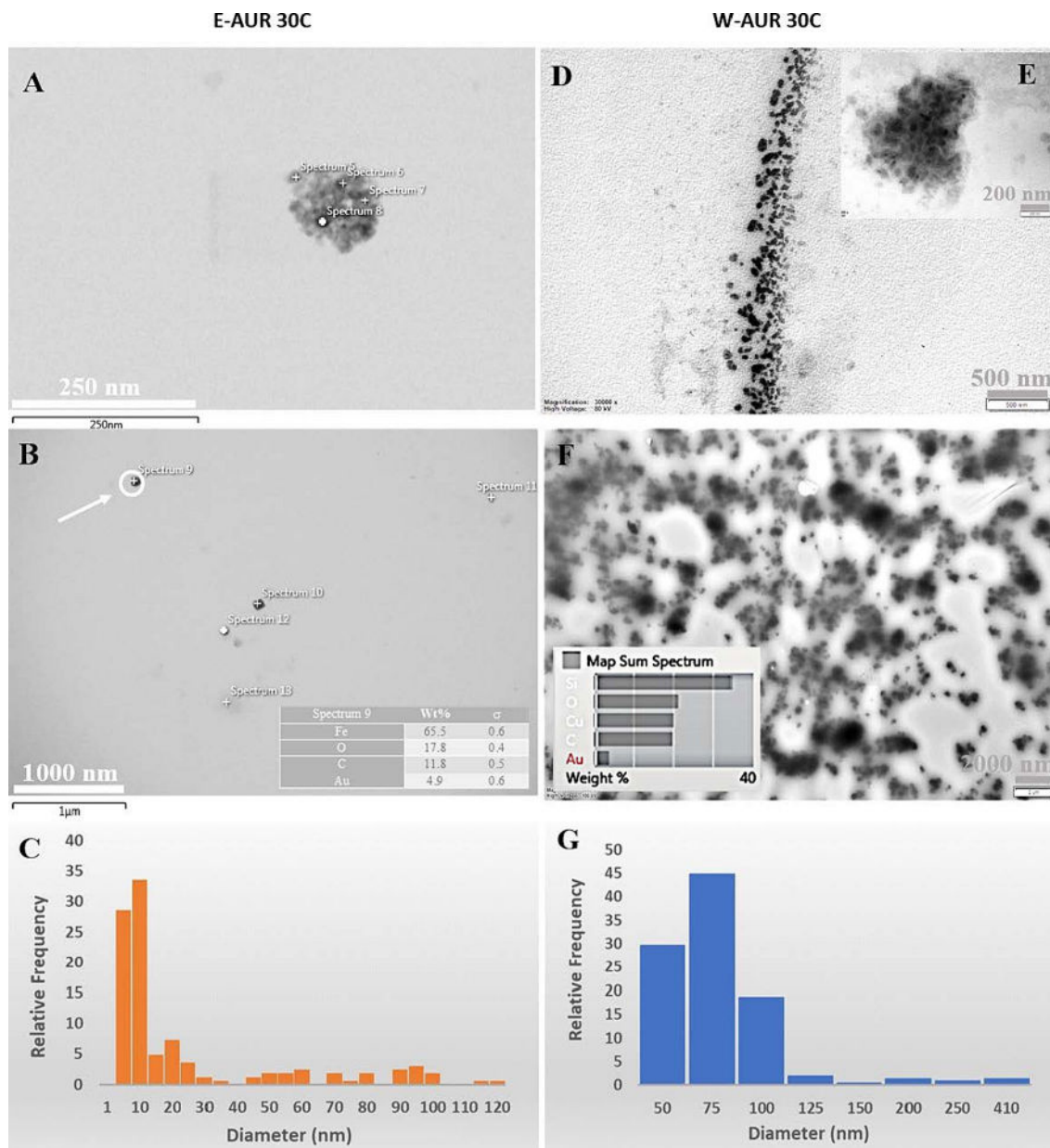


Figura 2. Date TEM pentru potența 30C a AUR. (A-C) Imagini TEM și histograma frecvenței relative a dimensiunilor nanoparticulelor pentru probele AUR pe bază de etanol și (D-G) pentru probele pe bază de apă; inserție - date EDX pentru punctele marcate sau spectrul sumativ.

3.2. Spectroscopia Raman și analizele de învățare profundă (deep learning)

După efectuarea studiilor TEM, o tehnică rapidă și nedistructivă, cum ar fi spectroscopia Raman, poate fi luată în considerare pentru analiza soluțiilor investigate. Din cauza ansamblurilor mai mari observate în TEM pentru probele pe bază de apă și având în vedere particularitățile Raman ale soluțiilor apă-etanol, spectroscopia Raman a fost aplicată doar soluțiilor pe bază de apă. Obiectivul a fost de a investiga transformările care apar în trei grupuri/categorii: PW, UW și AUR. PW este în general utilizată pentru prepararea remediilor homeopatice, în timp ce UW este o formă de apă parțial purificată; aceste tipuri de apă

posedă caracteristici diferite. În acest caz, remarcăm conductivitatea scăzută a probelor PW (0,7-0,88 $\mu\text{S}/\text{cm}$) și nivelurile scăzute de ioni ($\text{NO}_3^- < 0,2 \text{ ppm}$, $\text{Al} < 3-5 \text{ ppb}$, metale grele totale 0,00682 ppm); în plus, probele UW au o conductivitate mai mare (196 $\mu\text{S}/\text{cm}$), precum și concentrații mai mari de diferiți ioni (nitrat, bicarbonat, sodiu etc.). Pentru mai multe detalii, consultați secțiunea Materiale și metode.

Potențarea a fost aplicată probelor PW, UW și AUR preparate în trei zile diferite pentru a obține trei serii de probe potențate la potențele 6C, 30C și 200C. PW și UW nu sunt, în general, potențate pentru comercializare; procedura de potențare a fost aplicată doar pentru acest studiu. Astfel, 33 de probe au fost analizate prin spectroscopie Raman. Fiecare probă a fost analizată în 5 puncte pentru a obține date reprezentative pentru soluțiile investigate. Un total de 165 de spectre Raman (interval 180-4000 cm^{-1}) au fost supuse studiului de clasificare. Spectrele Raman brute și pretratate pentru eliminarea bg obținute în timpul acestui experiment, pentru diferite niveluri de potențare (6C, 30C și 200C) ale tipurilor de probe investigate (PW, UW și AUR), sunt prezentate în figurile S12-S17.

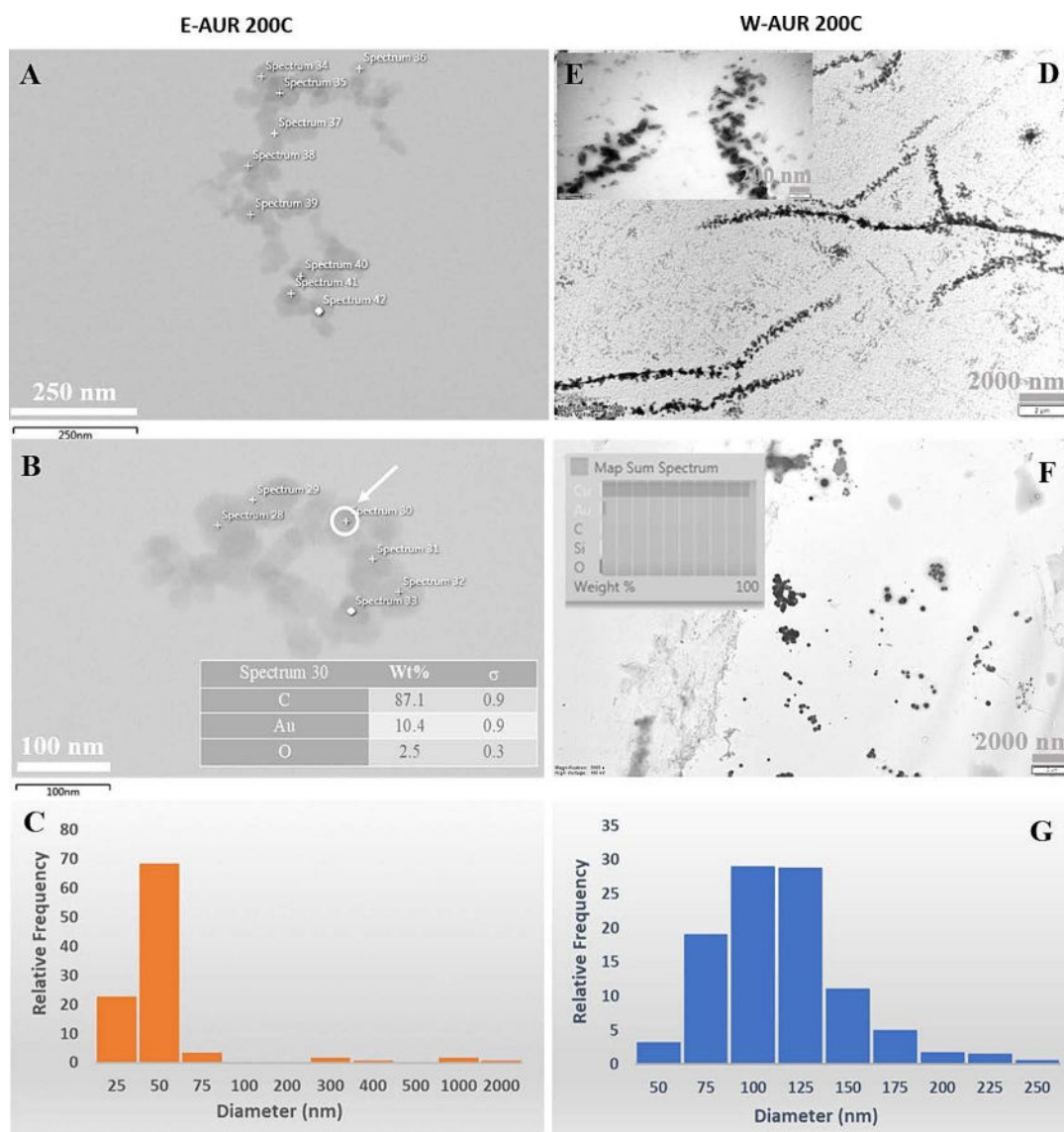


Figura. 3. Date TEM pentru potența de 200C a AUR. (A-C) Imagini TEM și histograma frecvenței relative a dimensiunilor nanoparticulelor pentru probele pe bază de etanol și (D-G) pentru probele pe bază de apă; inserție - date EDX pentru punctele marcate sau spectrul sumativ.

3.2.1. Clasificarea tuturor claselor cu învățarea profundă (DL) prin utilizarea modelului GRU

Rezultatele clasificării spectrale Raman pentru cele 11 clase diferite obținute cu ajutorul modelului GRU antrenat sunt ilustrate în figura 4; au fost luate în considerare atât seturile de date netratate, cât și seturile de date pretratate pentru eliminarea bg.

Pentru a oferi un rezumat al numărului de cazuri în care modelul GRU a prezis cu exactitate sau eronat rezultatul este întocmită matricea de confuzie. Modelul demonstrează o capacitate de recunoaștere foarte bună în compararea celor trei categorii investigate; astfel, acesta prezintă o eficiență mare în discriminarea între categoriile AUR, PW și UW atunci când sunt luate în considerare datele Raman netratate (figura 4A). În acest caz, se poate observa o acuratețe de 88 % (tabelul 1); această valoare poate fi considerată foarte bună, mai ales dacă se iau în considerare similitudinile mari dintre clasele investigate. Cauza acestei valori, puțin mai mică de 90%, este reprezentată în mare parte de rezultatul unor atribuiri greșite generate pentru diferite niveluri de potențare sau pentru eşantioane de referință aparținând aceleiași categorii; doar 3 atribuiri greșite au fost înregistrate între cele trei clase investigate - AUR, PW, UW (un eşantion de AUR200C a fost asociat la UW200C și două eşantioane de UW30C au fost atribuite la AUR6C și, respectiv, AUR200C).

Astfel, în cazul categoriei AUR, celelalte trei atribuiri greșite s-au datorat similitudinilor dintre diferitele niveluri de potențare din cadrul grupului. Un comportament similar a fost observat și în cadrul grupurilor PW și UW. Nu au existat erori legate de diferențierea probelor PW de AUR sau UW. În cadrul grupurilor PW și UW, recunoașterea corectă a fost observată pentru nivelul de potențare 200C, în timp ce pentru celelalte niveluri de potențare, până la 5 eşantioane au fost atribuite greșit (acest maxim a fost atins în clasa PW6C).

Cu toate acestea, atunci când modelul GRU a fost aplicat la setul de date pretratate pentru eliminarea bg, rezultatele au arătat o acuratețe de numai 59 % (figura 4B și tabelul 1). Majoritatea rezultatelor de clasificare incorectă au fost obținute în interiorul celor trei grupuri investigate, dar au existat, de asemenea, unele atribuiri greșite la eşantioane din afara grupului corespunzător. Aceste rezultate arată că slaba capacitate de recunoaștere a modelului se datorează pierderii de informații care a avut loc atunci când s-a aplicat scăderea zgomotului de fond la datele Raman. Grupurile AUR și UW par a fi cele mai afectate (figura 4B).

Tabelul 1 prezintă o analiză aprofundată a valorilor de performanță ale abordării propuse. Valorile precizie, recall și f1 pentru fiecare clasă au fost determinate independent. Rezultatele experimentelor au indicat că scorurile macro f1 pentru cele două seturi de date au fost de 0,88 și 0,59. În special, categoriile PW, PW6C, PW30C și PW200C au rate de recunoaștere stabile în ambele seturi de date. Atunci când sunt luate în considerare valorile recall, modelul are tendința de a subestima acuratețea clasificării eşantioanelor UW30C. Se poate deduce din constatările că, în general, puterea de discriminare a acestui model pentru datele UW este oarecum limitată. În plus, această lucrare investighează utilizarea unei abordări bine cunoscute de învățare automată, și anume mașinile cu vector suport (SVM - support vectorial machines), pentru clasificarea datelor Raman. Comparativ cu metoda de învățare profundă (GRU), tehnica tradițională de învățare automată (SVM) a obținut cele mai mici scoruri de precizie pentru cele două seturi de date.

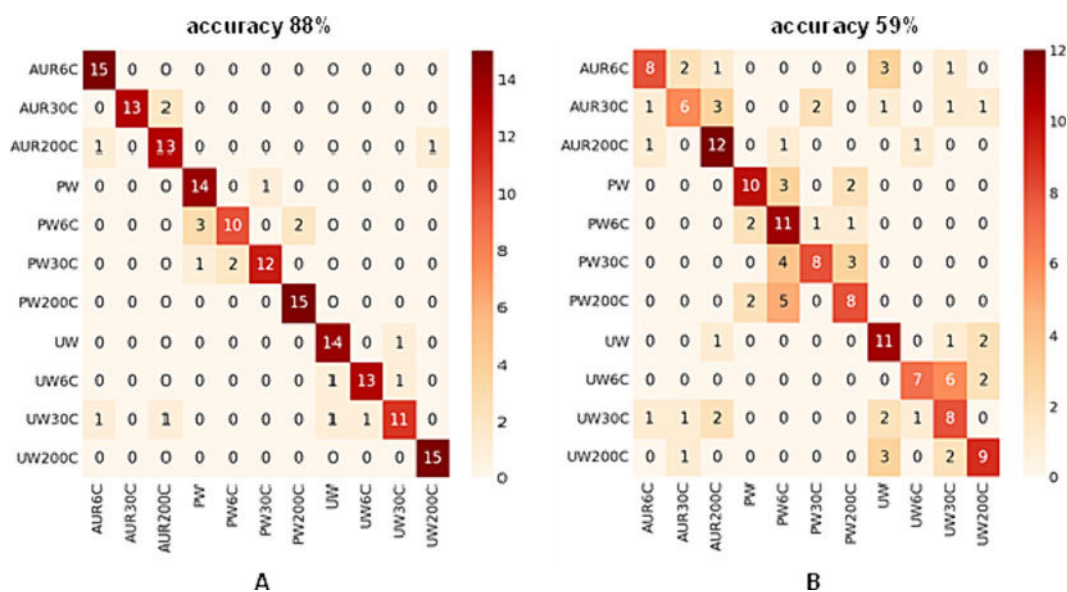


Figura 4. Matricea de confuzie a modelului GRU pentru (A) datele netratate și (B) datele pretratate ale tuturor categoriilor investigate

Tabelul 1. Rezultate de clasificare obținute cu date Raman netratate și cu date Raman fără zgomotul de fond (bg-pretratate)

	GRU						SVM					
	netratate			bg-pretratate			netratate			bg-pretratate		
	precizie	recall	f1	precizie	recall	f1	precizie	recall	f1	precizie	recall	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
media	0.88	0.88	0.88	0.62	0.59	0.59	0.61	0.61	0.61	0.36	0.35	0.35
macro	Acuratețe 88%			Acuratețe 59%			Acuratețe 61%			Acuratețe 35%		

Având în vedere aceste rezultate, a fost efectuată o investigație mai aprofundată, și anume a fost utilizată o abordare inteligentă de creștere a datelor pentru a mări dimensiunea setului de date. Astfel, prin utilizarea unei strategii de segmentare spectrală, fiecare spectru Raman a fost împărțit în segmente mai mici. S-a constatat că dimensiunile segmentului au fost de 1×1024 . De exemplu, atunci când dimensiunea eșantionului este decisă să fie de 1×12733 , se obține un total de aproximativ 12 segmente unice. Setul de date original conține 15 situații pentru o anumită clasă. După finalizarea procedurii de segmentare, setul de date este redimensionat la 1980×1024 și constă din 11 clase distincte. Astfel, dimensiunea eșantioanelor pentru fiecare clasă devine 180. Setul de date este apoi împărțit, 80 % fiind alocat pentru instruire, iar restul fiind rezervat pentru testare. Pentru a măsura performanța modelului nostru GRU, a fost aplicată validarea încrucișată de cinci ori pe seturile de date de segmentare obținute. În urma acestei abordări, s-a constatat că există o relație directă între creșterea dimensiunii segmentului și scăderea performanței. Rezultatele experimentale prezentate în figura S18 și în tabelul S1, obținute prin implicarea eșantioanelor din seturile de testare, demonstrează că modelul nostru GRU atinge un scor de precizie ridicat de 99,45 % pentru datele netratate și un scor de precizie perfectă de 100 % pentru datele pretratate pentru eliminarea bg în cele 11 clase distincte considerate. Chiar dacă, înainte de a propune strategia de segmentare spectrală ca fiind cea mai potrivită pentru experimentele care conțin un număr mare de clase, trebuie efectuate investigații suplimentare, și anume implicând un număr mai mare de eșantioane, această strategie poate fi considerată ca o abordare valoroasă de creștere a datelor pentru tipul nostru de date.

3.2.2. Clasificarea potențelor în cadrul fiecărui grup cu ajutorul Deep Learning prin utilizarea modelului GRU

Rata de recunoaștere obținută cu metoda DL în cadrul fiecărei categorii, (AUR 6C, AUR 30C, AUR 200C, PW), (PW, PW 6C, PW 30C, PW 200C) și (UW, UW 6C, UW 30C, UW 200C), a fost analizată prin implicarea datelor Raman netratate și bg-pretratate, iar rezultatele au fost comparate în ceea ce privește valorile de performanță. Figura 5 ilustrează rezultatele experimentelor după aplicarea validării încrucișate (CV) stratificate de 15 ori.

Pentru a repartiza eșantioanele în scopul validării și al procesului de învățare, am utilizat o tehnică de divizare în 15, în care 11 eșantioane sunt selectate pentru validare, iar restul eșantioanelor sunt destinate învățării. Pentru grupul AUR, clasa PW nepotențată a fost utilizată ca referință.

În cazul AUR vs. PW, matricile de confuzie generate demonstrează că au fost obținute precizii de 98 % și 78 %, figurile 5A,D. Rezultatele au arătat precizii de 90 % și 75 % pentru grupul PW, figurile 5B,E, în timp ce pentru grupul UW s-au obținut valori de precizie de 92 % și 68 %, figurile 5C,F. În general, grupurile PW6C și UW30C au performanțe scăzute comparativ cu celelalte clase. După efectuarea unei analize generale, este clar că grupul AUR are cele mai puține cazuri de clasificări incorecte și că cele mai multe clasificări eronate apar din cauza gradului mare de asemănare dintre clasele 6C și 30C.

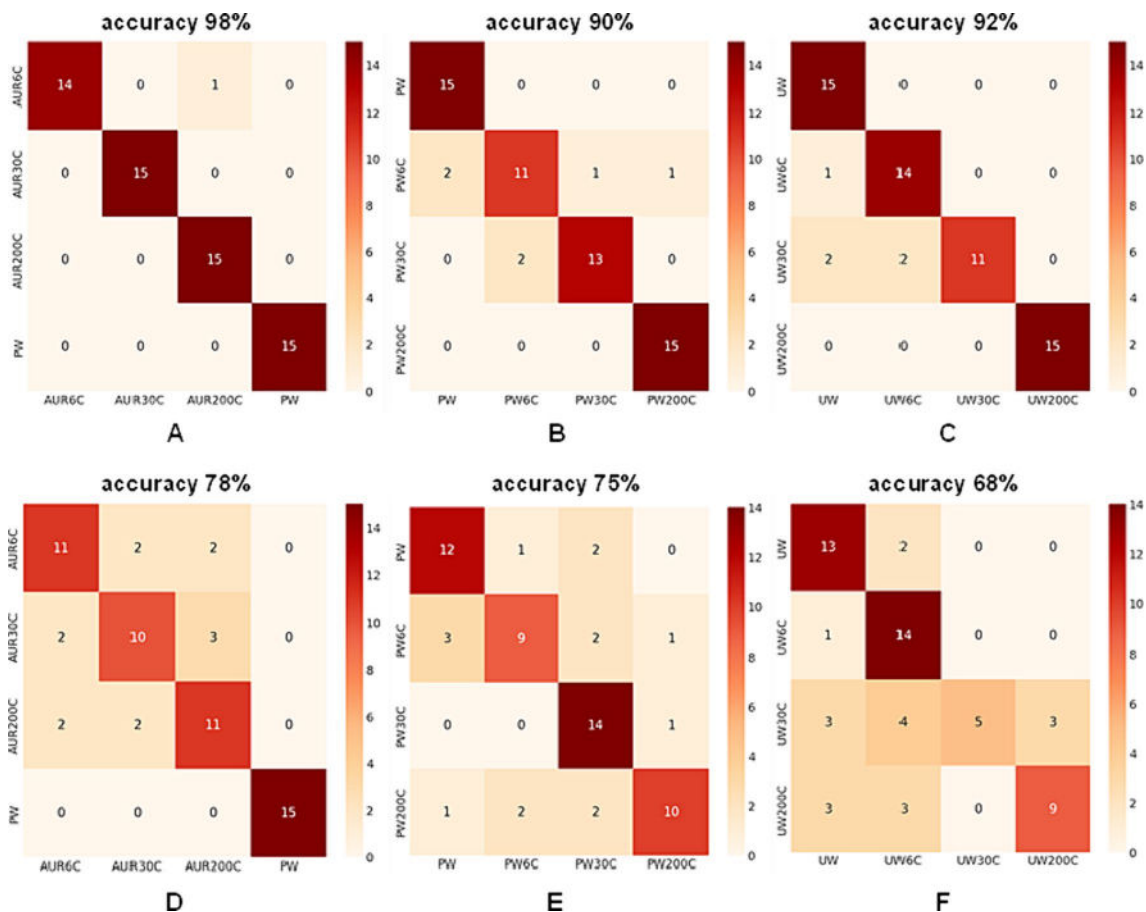


Figura 5. Performanța modelului de învățare profundă (deep learning) pentru evaluarea discriminării în cadrul fiecărui grup folosind date (A-B-C) netratate și (D-E-F) bg-pretratate.

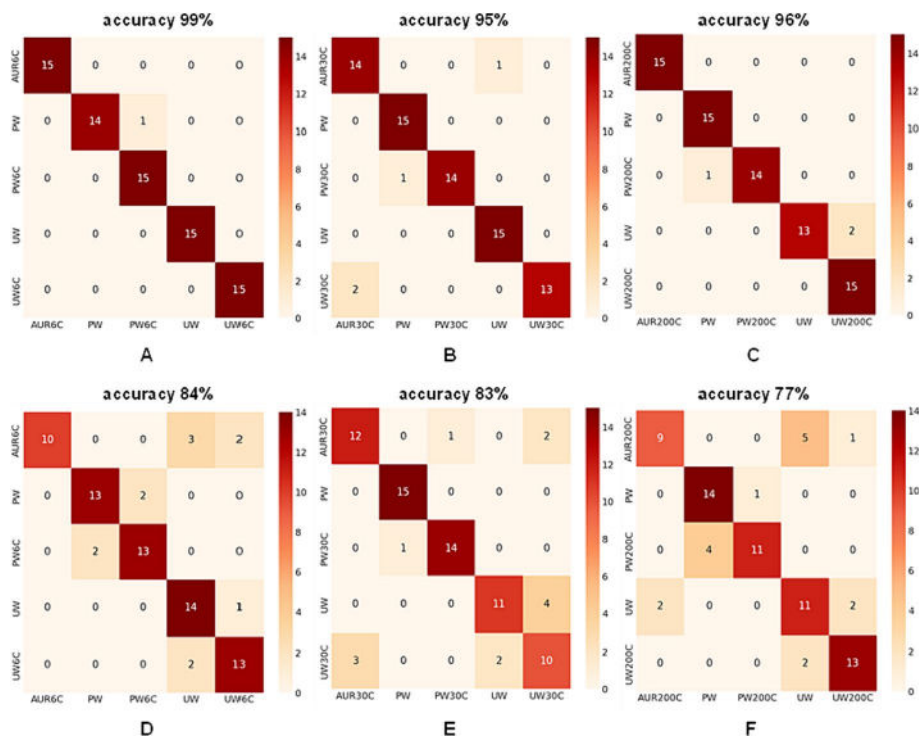


Figura 6. Performanța modelului de învățare profundă (deep learning) pentru evaluarea discriminării în cadrul fiecărui nivel de potențare folosind (A-B-C) date netratate și (D-E-F) date bg-pretratate

3.2.2. Clasificarea în cadrul aceluiași nivel de potențare cu învățarea profundă (deep learning) prin utilizarea modelului GRU

Suplimentar, a fost analizată performanța DL (deep learning) în discriminarea claselor din cadrul aceluiași nivel de potențare pe baza spectrelor Raman ale acestora (figura 6). Atunci când am clasificat nivelurile de potențare, am luat în considerare cinci clase, ce au inclus probele AUR, PW și UW potențate și probele PW și UW nepotențate ca referințe. Analiza rezultatelor a arătat că, pentru potențarea 6C, din modelul GRU s-au obținut valori de acuratețe de 99 % (netratat) și 84 % (bg-pretratat). De asemenea, pentru potența 30C s-au obținut valori de acuratețe de 95 % (netratat) și 83 % (bg-pretratat). Pentru potența 200C, modelul GRU a obținut valori de acuratețe de 96 % (netratat) și 77 % (bg-pretratat). Astfel, cea mai bună performanță a modelului GRU a fost observată în cazul soluțiilor cu diluție redusă (6C).

4. Discuții

Necesitatea de a găsi tehnici fiabile pentru caracterizarea eficientă a diluțiilor ultra-înalte este bine cunoscută. În acest studiu, arătăm că este posibil să se utilizeze o suită de metode (TEM-EDX și spectroscopia Raman în combinație cu DL) pentru caracterizarea și diferențierea cu succes a soluțiilor foarte diluate care se obțin după tratamentul de potențare. TEM-EDX poate fi utilizat pentru a evalua compoziția și morfologia oricărei soluții coloidale. Arătăm aici că această tehnică este eficientă chiar și pentru soluții foarte diluate, permițând obținerea de informații valoroase legate de fiecare nivel de potențare și, în acest fel, discriminarea lor prin crearea unei imagini care ar putea fi asociată cu fiecare nivel de potențare.

Ca o observație generală, morfologia soluției AUR 6C pare să fie similară cu cea a soluțiilor coloidale obișnuite de nanoparticule de aur [45]; dimensiunea nanoparticulelor de aur depinde de natura materiilor prime utilizate în procesul de preparare. În cazul celorlalte două potențe de AUR, 30C și 200C, designul lor pare să fie guvernat de legea construcției care prezice conceperea strategică a noilor arhitecturi pe baza unei legi a fizicii [46].

Si și O sunt cele două elemente omniprezente în probele AUR 30C, în timp ce în proba E-AUR 30C, ale cărei componente sunt mai mici (figura 2 și figurile S5-S7) sunt vizibile nanoparticule izolate care conțin impurități precum fier (Fe), titan (Ti), calciu (Ca), magneziu (Mg) și aluminiu (Al). Aceste impurități fie provin din solventul utilizat, fie ar putea fi formate în timpul tratamentului de potențare prin dizolvarea din flacoanele de

sticlă (de exemplu, Si sau Ti). Motivul pentru care aceste impurități sunt atât de evidente în potența 30C poate fi atribuit dimensiunii constituenților remediei, care sunt mai mici decât constituenții celorlalte două potențe (6C și 200C), așa cum este ilustrat în histogramele din figurile 1C și G, 2C și G și 3C și G. În plus, trebuie evidențiate profilul filiform observat în proba W-AUR 30C (figura 2D), apariția unor structuri pe bază de carbon (C) în E-AUR 30C (figura S7B) și prezența aurului în cele două probe de potență 30C (figura 2 insert și figurile S5 și S8B).

Toate aceste observații sugerează o organizare diferită pentru potențele 6C și 30C ale AUR și indică prezența atât a nanoparticulelor, cât și a ansamblurilor de clustere în probele 30C. Astfel, forma clară de nanoparticule a impurităților și ansamblurile filiforme/cluster formate din structuri mici promovează ideea că, cel puțin pentru AUR 30C, organizarea observată nu este legată în primul rând de sistemele de nanoparticule, ci mai mult de ansambluri mari (clustere) de structuri mici. Cel mai probabil, aceste clustere conțin, de asemenea, molecule de etanol și apă (în cazul AUR-E) sau apă (în cazul AUR-W), în timp ce impuritățile, fie izolate, fie legate de aceste ansambluri mari, apar sub formă de nanoparticule (formă rotundă clară și dimensiuni diferite). Deși aurul a fost identificat în toate probele investigate, acesta apare dispersat pe suprafața rețelei în imaginile de cartografiere TEM-EDX.

Rezultatele obținute pentru probele AUR 200C sugerează o organizare extinsă a moleculelor AUR 200C, indicând existența unor structuri stabile și organizate pe o suprafață mai mare. Impuritățile sunt prezente sub formă de ansambluri mari (figura S10B); astfel, în rezultatele cartografierii TEM-EDX se pot observa impurități mari (la scară micrometrică), cum ar fi Si, Al, Fe și O, legate între ele. Profilul filiform poate fi observat, de asemenea, pentru probele W-AUR200C (figurile 3A, 3D), precum și apariția unor structuri pe bază de carbon (C) în E-AUR 200C (figurile S10A și S10C), și prezența aurului în cele două tipuri de probe 200C investigate (figura 3 insert și figurile S9 și S11B).

Unele dintre aceste rezultate sunt susținute de datele din literatură; de exemplu, prezența aurului, chiar și la potențe ridicate (30C și 200C) de AUR care sunt dincolo de numărul Avogadro, a fost, de asemenea, prezentată în lucrările lui Chikramane et al. [10] și Rajendran [47]. În lucrarea lui Chikramane et al., compoziția elementală a particulelor TEM a fost identificată prin difracția electronică a zonei selectate (SAED-selected area electron diffraction) și confirmată prin analiza ICP-AES [10]. Studiul lui Rajendran evidențiază ideea că nanoparticulele se găsesc mai ales la scara de puncte cuantice în toate soluțiile [47]; dimensiunile particulelor lor sunt aproximativ similare cu cele din datele noastre. Această perspectivă a nanoparticulelor este susținută și de rezultatele noastre, dar în plus, rezultatele noastre demonstrează că structura AUR combină nanoparticule și aranjamente de tip cluster compuse din nanostructuri mai mici sau mai mari. Aceste aranjamente de tip cluster sunt mai evidente pentru diluțiile mari care sunt dincolo de numărul Avogadro și sunt influențate de natura solventului și de nivelul de potențare; cu cât potența este mai mare, cu atât structurile formate sunt mai ramificate și mai mari. Extinderea acestei organizări pe o suprafață mare ar trebui să conducă la structuri care sunt mai stabile și ar putea fi în acord cu legea constructivă a designului și evoluției în natură, așa cum este aceasta descrisă de Bejan și Lorente [46].

Pe lângă studiul TEM-EDX, am investigat dacă o metodologie bazată pe spectroscopie Raman și DL este capabilă să clasifice soluții care nu sunt semnificativ diferite ca structură, cum ar fi i) soluții PW versus UW, care prezintă diferențe subtile din moment ce UW-ul utilizat în aceste experimente este în esență o apă parțial purificată folosită în cosmetică și ii) soluții PW versus AUR, unde diferențele se datorează prezenței concentrațiilor foarte scăzute de aur în probele AUR. Mai mult, complexitatea și dinamica structurilor pe bază de apă produc un răspuns în regiunea Raman investigată (în special în intervalul de elongație OH), așa cum a demonstrat Sun [32] și alți câțiva autori [28-31].

Rezultatele obținute pentru toate cele trei situații investigate (clasificarea tuturor claselor, clasificarea potențelor în cadrul fiecărui grup (AUR, PW și UW) sau clasificarea în același nivel de potențare (6C, 30C și 200C) demonstrează că abordările DL pot fi utilizate pentru a recunoaște ușor și eficient diferitele clase. În setul de date cu semnalul de bază eliminat (și anume, bg-pretrat), modelul GRU nu este capabil să capteze tendința de date în ansamblul său. Pentru a obține rezultate mai bune pentru datele pretratate pentru eliminarea bg, am folosit normalizarea cuantificată. Mai mult, în acest caz, tehnica de normalizare a lotului a fost aplicată numai după stratul dens final al modelului. Un model cu două etape de recunoaștere ar putea fi propus ca extindere a studiului actual. Primul model ar fi responsabil cu determinarea tipului de eșantion, în

timp ce cel de-al doilea model ar putea să separe eșantioanele de testat în subclase din cadrul fiecărui tip de clasă de eșantioane. Această procedură necesită mult mai mult timp, dar se crede că ar produce rezultate superioare. În plus, pe baza rezultatelor obținute pentru studiul de discriminare care implică toate cele 11 clase și a unei abordări de augmentare a datelor, utilizarea unei metode de segmentare spectrală poate fi văzută ca o strategie valoroasă pentru creșterea acurateții predicției modelului.

5. Concluzii

În ansamblu, prin analiza rezultatelor obținute prin TEM-EDX și metodologia bazată pe spectroscopie Raman și algoritmi DL, putem susține că aceste metode pot fi utilizate cu succes pentru caracterizarea diluțiilor ultra-înalte. Această serie de tehnici a arătat o modalitate care ar putea sta la baza discriminării diferitelor remedii în funcție de natura substanțelor inițiale utilizate pentru prepararea remediilor sau ar putea permite diferențierea probelor în funcție de nivelul lor de potențare. Această abordare permite analiza soluțiilor foarte diluate la o scară mult mai mare decât se putea realiza anterior.

Declarație CRediT de contribuție a autorilor

Camelia Berghian-Grosan: Scriere – revizuire și editare, Scriere – textul original, Supraveghere, Metodologie, Analiză, Verificarea de date, Conceptualizare. **Sahin Isik:** Scriere – revizuire și editare, Scriere – textul original, Software, Metodologie. **Alin Sebastian Porav:** Scriere – revizuire și editare, Scriere – textul original, Metodologie, Analiză. **Ilknur Dag:** Scriere – revizuire și editare, Scriere – textul original, Supraveghere, Metodologie. **Kursad Osman Ay:** Scriere – revizuire și editare, Scriere – textul original, Supraveghere, Metodologie, Analiză. **George Vithoukaskas:** Scriere – revizuire și editare, Scriere – textul original, Metodologie, conceptualizare.

Declarație asupra conflictului de interese

Camelia Berghian-Grosan și George Vithoukaskas declară că taxele de publicare a articolului au fost asigurate de Academia Internațională de Homeopatie Clasică. George Vithoukaskas declară o relație cu Academia Internațională de Homeopatie Clasică care include: calitatea de membru al consiliului de administrație. Ceilalți autori declară că nu au interese financiare concurente cunoscute sau relații personale care ar fi putut sugera o influență asupra activității raportate în această lucrare.

Disponibilitatea datelor

Datele vor fi disponibile la cerere.

Mulțumiri

Autorii doresc să mulțumească Academiei Internaționale de Homeopatie Clasică (I.A.C.H.) - Alonissos (Grecia) pentru sprijinul acordat acestei cercetări și dr. Drosos Kourounis pentru sugestiile și corecțiile sale care au îmbunătățit considerabil calitatea acestui manuscris. Mulțumiri speciale sunt adresate Farmaciei Korres și domnului George Korres (Grecia, www.korres.com) pentru prepararea soluțiilor homeopate.

Anexa A. Material suplimentar

Date suplimentare al acestui articol pot fi accesate online la <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124537>.

Bibliografie

- [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*, republicatã, 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 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. 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. 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. Schöneich, 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. Vithoukas, 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-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 Gavà, *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.