



Scuola di Medicina Omeopatica di Verona

Vicolo Dietro Santi Apostoli, 2 – 37121 Verona tel 0458030926 – fax 0458026695 cell. 329 4744580 email info@omeopatia.org
www.omeopatia.org

Tesi

“ Spettroscopia IR applicata alla ricerca in omeopatia”

dott.ssa Margherita Ballo

Relatori

*prof. Paolo Bellavite,
dott. Federico Allegri*

Anno Accademico 2010-2011

Indice

Premessa	pag	3
Riassunto	pag	3
Introduzione	pag	4
<i>La ricerca in omeopatia</i>	pag	4
<i>Le basi fisico - chimiche delle alte diluizioni</i>	pag	4
I modelli teorici	pag	5
Le prove sperimentali e le tecniche analitiche impiegate	pag	6
La spettroscopia IR	pag	8
<i>La spettroscopia IR in trasformata di Fourier</i>	pag	10
<i>Applicazioni generali della spettroscopia IR</i>	pag	11
<i>Applicazioni della spettroscopia IR all'omeopatia</i>	pag	12
<i>Studi in letteratura di spettroscopia IR applicata all'omeopatia</i>	pag	16
Parte sperimentale	pag	19
<i>Scopo della tesi</i>	pag	19
<i>Materiali e metodi</i>	pag	19
<i>Risultati</i>	pag	21
<i>Discussione</i>	pag	24
<i>Conclusioni</i>	pag	25
Ringraziamenti	pag	25
Bibliografia	pag	26

Premessa

L'idea di questa tesi nasce dall'esigenza di trovare un compromesso tra il mio lavoro e la passione per l'omeopatia. Tra quello che faccio e quello che mi piacerebbe fare.

Ho intravisto il punto di incontro nella elaborazione di una tesi sperimentale che non sapevo dove mi avrebbe portato, ma mi affascinava a tal punto da non voler rinunciare al progetto.

L'opportunità nasceva da uno strumento messo a disposizione dal laboratorio della farmacia per cui lavoro, uno spettroscopio ad infrarossi acquistato per il riconoscimento di materie prime impiegate nell'allestimento di preparazioni galeniche.

Leggendo il libro dei Sukul sulle alte diluizioni [1], ero venuta al corrente dei loro studi con spettroscopia IR applicata all'omeopatia, e da qui sono partita.

Mi sono rivolta al prof. Paolo Bellavite, che ha accolto la proposta di aiutarmi a muovere i primi passi in un campo obiettivamente difficile da esplorare.

E infatti le difficoltà ci sono state. A questo proposito mi viene in mente il consiglio di una mia docente della scuola di Verona, dopo aver saputo che genere di tesi volevo svolgere; il senso delle sue parole era: bellissima idea ma ricorda che sei una mamma con due bambini piccoli, devi scegliere cose fattibili che sai di poter terminare.

La tesi è rimasta in sospeso per qualche tempo. Poi è bastato un piccolo spunto, una parola di incoraggiamento da parte dei miei docenti, per decidere di completare il lavoro raccontando ciò che era stato fatto.

Riassunto

Obiettivo

Osservare se spettri infrarossi di diversi rimedi omeopatici e di diverse potenze dello stesso rimedio differiscono tra loro e rispetto allo spettro del solvente di diluizione.

Metodo

Spettri FT-IR di

etanolo 30% non dinamizzato

gelsemium 1CH

etanolo 30% 1CH

gelsemium 2CH

etanolo 30% 2CH

gelsemium 29CH

etanolo 30% 29CH

oscillococcinum 200k

etanolo 30% 200k

sono stati ottenuti in un range di 4000 – 400 cm^{-1} a 24°C.

Gli spettri sono stati registrati posizionando una goccia del campione sul cristallo in ZnSe, dell'accessorio ATR dello spettroscopio FT-IR.

Sono stati osservati i picchi caratteristici degli spettri ottenuti in termini di frequenza (numero d'onda) e intensità di assorbimento (trasmittanza).

Risultati

I campioni esaminati mostrano piccole differenze nell'intensità dei picchi (trasmittanza) nel confronto tra gli spettri della potenza omeopatica rispetto al placebo.

Conclusioni

Le differenze di intensità dei picchi osservate negli spettri IR ottenuti suggeriscono che diverse potenze omeopatiche di gelsemium differiscono dal loro placebo in termini di struttura molecolare dell'acqua, in particolare nell'assetto dei legami idrogeno.

Significativi sono i risultati ottenuti dal confronto tra gelsemium 1CH, 2CH, 29CH con i rispettivi placebi.

Introduzione

La ricerca in omeopatia

Quando mi sono avvicinata al tema della ricerca in omeopatia, mi sono immediatamente posta il problema di quanto vasto fosse il campo, e il primo passo è stato quello di capire quali e quante domande deve porsi e cercare di evadere, chiunque voglia giustificare l'omeopatia.

In questo modo mi sono subito trovata di fronte a tre grandi filoni di ricerca:

***lo studio delle evidenze cliniche, ossia la dimostrazione che il farmaco in alte diluizioni (cioè in assenza di molecole) sortisce un effetto terapeutico.

***la ricerca delle prove sperimentali che la soluzione idroalcolica altamente diluita contiene informazione riguardante il principio attivo del medicinale di partenza (tintura madre).

Ossia può un solvente, incorporare e mantenere qualche forma di organizzazione che sia veicolo di informazioni in assenza del soluto originario?

In altre parole esiste la memoria dell'acqua e come eventualmente la si può spiegare?

***lo studio del meccanismo d'azione in base al quale soluzioni così diluite possano avere risultati terapeutici tangibili.

Ossia ammettendo che ordine e informazione possano essere incorporate e mantenute nelle soluzioni altamente diluite, come esse possono interagire con il livello biologico.

Le basi fisico - chimiche delle alte diluizioni

L'oggetto di questa tesi si colloca nel secondo filone, nello studio delle basi fisico-chimiche delle alte diluizioni.

Il tentativo è quello di spiegare come l'impronta del rimedio con le sue specifiche proprietà terapeutiche si conservi all'interno di una soluzione nella quale il rimedio (soluto) è stato sciolto, e sottoposto ad un numero di diluizioni tale da non lasciare traccia di molecole.

Ricordiamo che il limite di diluizione oltre il quale si parla di assenza di molecole, è stabilito dal numero di Avogadro (numero di particelle contenute in una mole di sostanza). Se un rimedio è diluito successivamente con il solvente nella proporzione di 1:100 per 12 volte, cioè fino alla dodicesima potenza, la sua diluizione è di $10^{(24)}$ volte e la sua concentrazione (partendo da una soluzione 1mole/litro) è di $10^{(-24)}$ moli/litro. Poiché il numero di Avogadro per qualsiasi sostanza è

di $6.022 \times 10^{(23)}$, le potenze dalla $12^{(a)}$ centesimale in poi, ottenute da una mole di qualsiasi sostanza, non dovrebbero contenere più alcuna molecola del principio attivo.

I modelli teorici

Ci sono molte ipotesi ed esperimenti che hanno tentato di spiegare le basi chimico fisiche dei medicinali omeopatici; tutte le ipotesi sono basate sulle proprietà del mezzo diluente.

Passiamo in rassegna i modelli teorici. I principali sono 3:

**I clusters

**I domini di coerenza

**Le nanoparticelle

I Clusters

Questo modello sostiene che la memoria dell'acqua sarebbe basata sulla formazione di aggregati di molecole di acqua, clusters o clatrati, dal latino "clathrus" (= inferriata), formazioni cave che verrebbero ad assumere le molecole con una disposizione a rete, ripiegata attorno ad una nicchia interna [2-4].

La possibilità di formazione di cavità in liquidi è universalmente accettata.

Nell'acqua le molecole possono allinearsi in forme pentagonali o esagonali grazie ai legami idrogeno.

A loro volta, varie conformazioni poligonali possono costruire figure geometriche complesse, cave al loro interno [5-7].

Un certo numero di molecole del composto originale, una volta sciolto, verrebbe circondato da un maggior numero di molecole di acqua che formano un piccolo guscio, una nicchia.

In seguito a diluizione e succussione queste figure geometriche complesse persistono anche in assenza di soluto, ma con le caratteristiche di conformazione impresse dal soluto.

I clatrati sarebbero configurazioni dinamiche che si sciolgono e riorganizzano continuamente, ma sempre con lo stesso schema. Questo permetterebbe di mantenere traccia della struttura di partenza.

I domini di coerenza

Diverso è l'approccio seguito dal gruppo di studio di fisica nucleare di Milano (E. Del Giudice, G. Preparata e collaboratori).

Gli autori si riallacciano alle teorie dell'elettrodinamica quantistica (Quantum ElectroDynamics: QED), dando una lettura completamente nuova della materia condensata [8-11].

Le molecole di acqua non sono in relazione tra di loro mediante semplici interazioni statiche (legami idrogeno, interazioni dipolo-dipolo). Le interazioni tra atomi e molecole non sono ristrette ai "vicini", ma si estendono secondo domini la cui grandezza dipende dalla lunghezza d'onda del campo elettromagnetico della materia che li compone. Questi domini di coerenza sono i "mattoni" con cui è costruita la materia condensata; all'interno dei domini gli atomi e le molecole oscillano con un campo elettromagnetico la cui radiazione è permanentemente intrappolata all'interno del dominio di coerenza e la sua funzione è di mantenere stabile il sistema di fronte agli assalti dissipativi delle fluttuazioni termiche [12-14].

I domini di coerenza che si creano all'interno dell'acqua liquida permettono una libera circolazione di elettroni all'interno dei domini. In virtù di questo aspetto, i domini di coerenza dell'acqua hanno

proprietà uniche rispetto ad altri liquidi: sono capaci di ricevere energia incoerente (ad alta entropia) dall'ambiente e trasformarla in energia a bassa entropia e altamente coerente.

E' l'acqua coerente che ha proprietà di "memoria", cioè di immagazzinare le frequenze dei campi elettromagnetici con cui viene a contatto, come ad esempio le molecole di una sostanza disciolta in acqua, con cui si prepara un rimedio omeopatico.

Le nanoparticelle

Con il termine di nanoparticella si identificano normalmente delle particelle formate da aggregati atomici o molecolari con un diametro compreso indicativamente fra 2 e 200 nm.

Le nanoparticelle hanno una maggiore biodisponibilità, capacità di adsorbimento, aiutano le reazioni biochimiche e hanno particolari proprietà elettromagnetiche e quantistiche, diverse dalle caratteristiche dello stesso materiale in forma grezza [15, 16].

L'agitazione meccanica fatta in contenitori di vetro, introduce nella diluizione nano particelle di composti silicati quali il biossido di silicio. Questi contaminanti potrebbero avere un ruolo nel mantenimento della struttura dell'acqua associata ad un particolare rimedio.

A sostegno di questo modello si sono schierati diversi autori, benché la suddetta ipotesi fosse criticabile per l'ovvia ragione della non specificità del materiale contaminante vetroso rispetto al materiale di origine.

Partendo dal presupposto che l'acqua non può mantenere la conservazione di una informazione per più di 50 fsec (=femtosecondo = sec 10^{-15} ; le reazioni chimiche più veloci vengono misurate con questa unità di tempo), a causa della velocità di riarrangiamento dei legami idrogeno, si introduce il concetto che questi contaminanti, in qualità di nano particelle, potrebbero funzionare da centri auto organizzatori di strutture complesse[17]. In sintesi le particelle contaminanti sarebbero in grado di mantenere l'impronta dello stato clatriforme generato inizialmente dal principio attivo, lungo tutto il processo di potentizzazione, fornendo un substrato informativo.

I silicati, contenuti nella chimica del vetro, sarebbero protagonisti attivi delle proprietà di ritenzione informativa dell'acqua in assenza di soluto [18].

Le prove sperimentali e le tecniche analitiche impiegate

Nel tentativo di dare evidenza sperimentale a quanto sopra discusso, diversi autori hanno applicato tecniche analitiche alla ricerca di prove.

I risultati ottenuti mostrano la plausibilità delle teorie precedentemente illustrate per spiegare il fenomeno delle diluizioni omeopatiche, ma non forniscono ancora una base solida e rigorosa dal punto di vista scientifico. Questo perché nella realizzazione degli esperimenti sussiste il problema della riproducibilità.

I risultati infatti sono condizionati dalla minima variazione delle condizioni metodologiche. Hanno influenza la temperatura, l'umidità, la modalità di lavoro dell'operatore, il metodo usato, lo strumento e la sua sensibilità, il giorno in cui si esegue l'esperimento, il tempo che intercorre tra un'analisi e quella successiva, la qualità dei campioni, come sono stati preparati, il metodo di succussione, il modo in cui i campioni vengono conservati.

Il gruppo di studio di Napoli del dr. Elia ha condotto esperimenti con le tecniche di pHmetria, calorimetria, conducibilità elettrica [19-21].

Da questi studi si può affermare che esiste una differenza misurabile tra i parametri chimico-fisici relativi al solvente acqua e alle diluizioni omeopatiche. Tali differenze sarebbero imputabili alla diversa organizzazione delle molecole di acqua della diluizione omeopatica rispetto al solvente di partenza e il cambio di conformazione sarebbe innescato dal processo di dinamizzazione.

Lous Rey ha condotto studi di diluizioni omeopatiche con la tecnica della termoluminescenza [22, 23], confermate anche da altri[24].

Alte diluizioni di cloruro di litio e di cloruro di sodio sono state congelate e irradiate con raggi X e gamma per poi essere successivamente riscaldate fino a temperatura ambiente.

Durante questa fase le soluzioni emettono energia sotto forma di luce con caratteristici picchi frequenziali. E' stato visto che nonostante la loro diluizione, la luce emessa era caratteristica dei sali originali disciolti all'inizio.

Gli autori ipotizzano che il fenomeno derivi da un cambiamento strutturale nelle rete dei legami idrogeno, avviato all'inizio dagli ioni dissolti, conservato nel processo di diluizione e imputabile probabilmente a successivi scuotimenti meccanici.

Un altro approccio chimico fisico è stato seguito dal gruppo di Iris Bell dell'Arizona. Attraverso un sistema computerizzato per visualizzare la scarica di gas che si verifica quando un campione è sottoposto a scarica elettrica, gli studiosi hanno analizzato immagini di medicinali omeopatici e confrontato con il puro solvente, ricavandone immagini chiaramente distinguibili [25].

Altre ricerche riguardano l'analisi degli spettri (bande di assorbimento, di emissione o di risonanza di onde elettromagnetiche a diverse frequenze o intensità) di diluizioni omeopatiche, ottenuti con le tecniche del Raman laser, della spettroscopia UV-VIS, della risonanza magnetica nucleare (NMR) e dell'infrarosso, oggetto del nostro studio (una rassegna completa nel lavoro di Bellavite [17]).

Le metodiche spettroscopiche si basano sulla interazione tra una radiazione elettromagnetica e la materia, con assorbimento della radiazione da parte di quest'ultima.

Per radiazione si intende la propagazione di energia tramite onde e/o corpuscoli; nel caso della radiazione elettromagnetica, questa si riferisce all'energia elettromagnetica, responsabile della propagazione di un'onda nel campo elettromagnetico.

Il campo elettromagnetico è la combinazione del campo elettrico e del campo magnetico.

E' generato localmente da qualunque distribuzione di carica elettrica variabile nel tempo e si propaga sotto forma di onde elettromagnetiche.

In fisica lo spettro elettromagnetico indica l'insieme di tutte le possibili frequenze delle radiazioni elettromagnetiche.

Le radiazioni elettromagnetiche, in generale, sono un trasferimento di energia sotto forma di onde, caratterizzate da una lunghezza d'onda e da una frequenza. Poiché la lunghezza d'onda e la frequenza di una radiazione sono inversamente proporzionali, tanto minore sarà la lunghezza d'onda, tanto maggiore sarà la frequenza e quindi l'energia del fotone (che equivale alla sua frequenza moltiplicata per la costante di Planck). Pur essendo lo spettro continuo, è possibile una suddivisione puramente convenzionale ed indicativa in vari intervalli o bande di frequenza.

L'intero spettro è suddiviso nella parte di spettro visibile che dà vita alla luce e le parti di spettro non visibile a lunghezza d'onda maggiori e minori dello spettro visibile. Le onde di maggiore lunghezza d'onda dal visibile alle onde radio hanno poca energia e risultano scarsamente dannose, le radiazioni comprese tra l'ultravioletto e i raggi gamma invece hanno più energia, sono ionizzanti e quindi possono danneggiare gli esseri viventi.

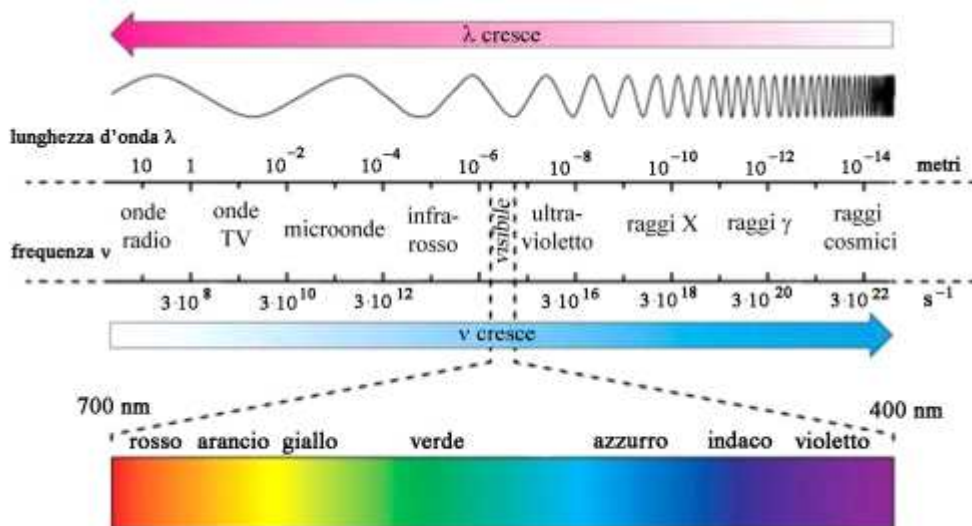


Fig. 1 Lo spettro elettromagnetico.

Le tecniche spettroscopiche sono accomunate dal principio di quantizzazione dell'energia.

A differenza dei sistemi con cui entriamo a contatto nel mondo macroscopico, che assorbono energia in modo continuo, i sistemi atomici e molecolari possono assorbire solo quantità discrete di energia (quanti). Perciò atomi e molecole possono assorbire o liberarsi della propria energia solo compiendo dei salti tra livelli energetici quantizzati.

Ciò fa sì che ogni specie molecolare dia luogo a spettri caratteristici, perché l'energia assorbita o emessa deve essere uguale alla differenza tra quelle possedute dai due livelli coinvolti nella transazione, che è peculiare di ogni specie chimica.

Una delle tecniche spettroscopiche applicate all'omeopatia è la risonanza magnetica nucleare (spettroscopia NMR), oggi nota soprattutto per le sue applicazioni nella diagnostica per immagini, ma è anche usata per studiare atomi e molecole in quanto permette di indagare il comportamento del nucleo dell'atomo quando sottoposto ad un campo magnetico.

Il nucleo in virtù del suo momento dipolare può entrare in risonanza con onde elettromagnetiche e ogni tipo di atomo ha una sua particolare frequenza di risonanza.

Quindi lo spettro NMR (il grafico con i picchi di risonanza) è direttamente correlato alle componenti del campione e alla geometria delle molecole.

Gli autori Smith e Boericke [26, 27] dimostrano che la struttura del solvente (etanolo e acqua), così come appare nella regione relativa al segnale dell'OH e dell'acqua nello spettro, viene modificata nelle diluizioni seriali. La modifica è più marcata se si attua la succussione.

Altri studi (SUKUL2001, SUKUL2000)[28] evidenziano che spettri NMR di alte diluizioni mostrano picchi diversi dal semplice solvente, nel tempo di rilassamento T1 (parametro complesso che esprime le caratteristiche di risonanza).

La spettroscopia IR

Per spiegare questa metodica è necessario chiarire che gli atomi di una molecola non sono connessi rigidamente tra loro. Ogni molecola può dar luogo ad un certo numero di vibrazioni di legame, in base alla sua struttura e al numero di atomi che la compongono.

Ci sono due tipi di vibrazione alla quale una molecola può essere sottoposta (fig 2):

**stretching o vibrazione di stiramento, movimento che porta ad un allungamento o accorciamento del legame OH (nel caso dell'acqua) lungo l'asse del legame;

**bending o vibrazione di piegamento, movimento che porta ad uno spostamento degli atomi da un asse ad un altro (deformazione degli angoli di legame);

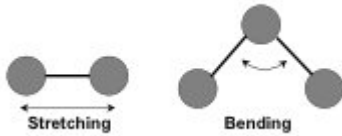


Fig. 2 : vibrazioni di stiramento e di piegamento dei legami tra gli atomi.

le vibrazioni (stiramento e piegamento) di coppie di atomi impegnati in un legame sono responsabili di selettivi assorbimenti di radiazioni infrarosse ($4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$), quindi lo spettro IR, vale a dire il profilo della radiazione trasmessa (trasmissione percentuale) in funzione della frequenza della radiazione, costituisce un'importante fonte di informazioni sulla struttura di un composto.

L'assorbimento avviene solo quando la radiazione fornisce la giusta quantità di energia, che è in grado di far passare la molecola da uno stato energetico all'altro.

La differenza tra questi livelli energetici (DE) è correlata alla frequenza (ν) della radiazione attraverso la costante di Planck (h):

$$DE = h\nu$$

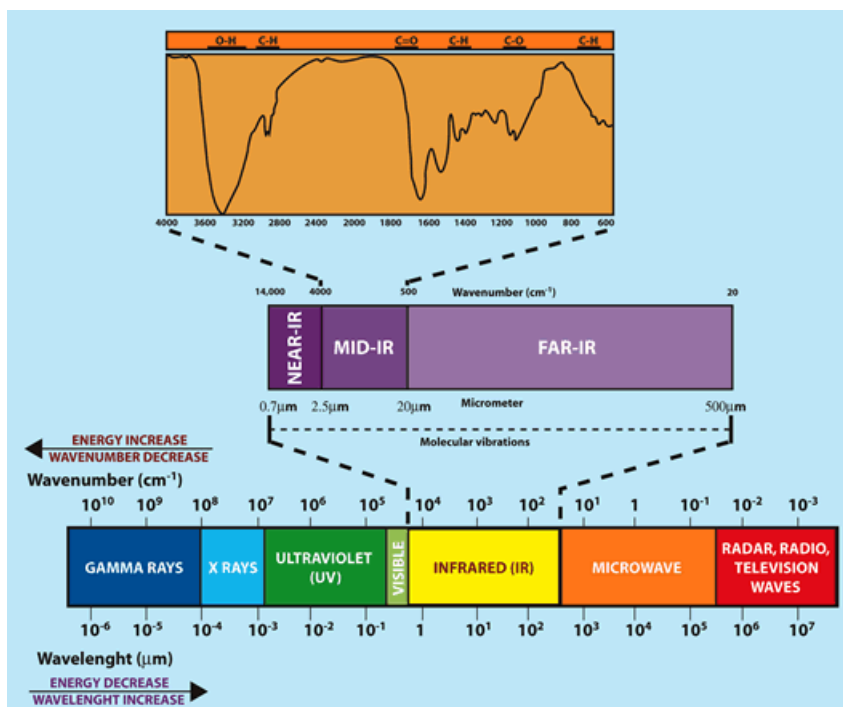


Fig. 3 - Regioni spettrali della radiazione elettromagnetica con espansione della regione infrarossa. In alto è riportato un tipico spettro IR.

Si può suddividere lo spettro in tre diverse zone:

1. zona dei gruppi funzionali, che si estende da 3800 a 1300 cm^{-1} e comprende bande dovute sia a stiramenti che a deformazioni di gruppi funzionali (per esempio legami N-H, O-H, C-H, C=C, C=O, N=O, ecc.), con questi ultimi compresi tra 1600 e 1300 cm^{-1} . È da notare che i legami con l'idrogeno si trovano a frequenze molto alte per via della massa molto ridotta di quest'atomo;
2. zona delle impronte digitali, da 1300 a 650 cm^{-1} , che deve il suo nome alla presenza di bande strettamente caratteristiche di ciascuna singola molecola, in quanto originate da vibrazioni corali dell'intero scheletro molecolare;
3. zona del lontano IR, che si estende da 650 a 200 cm^{-1} e presenta bande dovute a stiramenti di atomi pesanti, deformazioni di gruppi privi di idrogeno e vibrazioni di scheletro.

I picchi risultanti si distinguono fra acuti e ampi: questi ultimi in particolare riflettono il carattere di un legame che può vibrare in un raggio di frequenze a seconda dell'ambiente chimico in cui si trova (notevole il caso dello stiramento del legame a idrogeno che produce un riconoscibile picco fra 3000-3500 cm^{-1}).

La spettroscopia IR in trasformata di Fourier

La scelta della spettroscopia IR in trasformata di Fourier rappresenta un miglioramento nell'acquisizione dei dati perché lo strumento è in grado di lavorare con tempi brevissimi, registrando simultaneamente l'intero spettro IR, minimizzando il rumore di fondo.

La radiazione emessa dalla sorgente incontra un separatore di raggio costituito in modo che circa metà dell'intensità della radiazione sia riflessa su di uno specchio fisso che la rimanda indietro al separatore e poi al rivelatore, dopo aver attraversato la cella portacampione; l'altra metà della radiazione viene invece trasmessa e inviata su di uno specchio mobile che lo riflette indietro al separatore di raggio e da qui al rivelatore.

Quest'ultimo registra un interferogramma. La trasformata di Fourier ci permette di ottenere dall'interferogramma l'intensità del segnale in funzione della frequenza. Questa operazione è eseguita dal computer.

Lo strumento impiegato nell'esperimento di questa tesi è dotato di un accessorio ATR (dall'inglese "attenuated total reflectance").

La riflettanza totale attenuata è una tecnica di campionamento della spettroscopia infrarossa che sfrutta la riflessione del raggio che attraversa il campione.

In questa tecnica il campione è posto in stretto contatto con un elemento ottico definito "elemento di riflessione interna" (o cristallo ATR) costituito da un cristallo a elevato indice di rifrazione. Il raggio IR emesso dalla fonte, prima di giungere al campione, passa dapprima attraverso questo elemento: questo genera il fenomeno noto come riflessione totale. Questo raggio riflesso, arrivando sulla superficie del campione che costituisce l'interfaccia, può penetrarvi fino a un certo spessore in modo da formare un'onda evanescente, che a seguito dell'assorbimento di radiazione da parte del campione risulterà in un raggio attenuato; in questo modo è possibile registrare lo spettro ATR.

I materiali più comunemente utilizzati per produrre cristalli ATR sono il germanio, il silicio, e il seleniuro di zinco (nel mio caso). Viene anche utilizzato il diamante, in particolare nel caso di

campioni particolarmente duri che potrebbero produrre un danneggiamento del cristallo (come nel caso di alcuni minerali).

Questa tecnica richiede poca o nessuna preparazione del campione. Inoltre, non essendo distruttiva, può essere sfruttata in tutti quei casi che richiedono che il campione resti integro, come nel caso di reperti archeologici, opere d'arte.



Fig. 4 Spettroscopio FT-IR.



Fig 4a Accessorio ATR con cristallo di ZnSe.

Applicazioni generali della spettroscopia IR

La spettroscopia IR è riportata dalla Farmacopea Ufficiale per l'identificazione della maggior parte dei farmaci aventi struttura organica.

Da un esame delle bande di assorbimento nella zona 4000-1300 cm^{-1} dello spettro IR, è possibile individuare la presenza dei più importanti gruppi funzionali (NH_2 , OH, $\text{C}=\text{O}$, ecc.).

Inoltre le vibrazioni dello scheletro molecolare (vibrazione dei legami C-O, C-N, C-C, ecc) danno luogo a bande di assorbimento che costituiscono l'impronta digitale (1300-650 cm^{-1}) e sono di grande valore per confermare l'identità di un composto.

La spettroscopia IR è ideale per svolgere analisi di prodotti gassosi in ambienti di lavoro, in impianti industriali e anche per il monitoraggio dell'inquinamento ambientale in centri urbani.

Applicazioni all'omeopatia, interazioni dipolo- dipolo e legami idrogeno

Il legame dipolo-dipolo è una interazione debole che si instaura tra molecole dipolari, aventi una estremità positiva e una estremità negativa.

Nell'interazione dipolo-dipolo le molecole dipolari si dispongono in modo ordinato, tale per cui l'estremità positiva di ciascuna si trova vicina all'estremità negativa della molecola più prossima.

Il legame idrogeno è un caso particolare di interazione dipolo-dipolo che si instaura quando il polo positivo del dipolo è un atomo di idrogeno. Poiché l'atomo di idrogeno possiede un solo elettrone, quando esso si impegna in un legame covalente polare, il suo nucleo viene praticamente denudato, e la densità di carica positiva corrispondente è molto alta.

Un esempio di legame idrogeno si osserva nell'acqua:

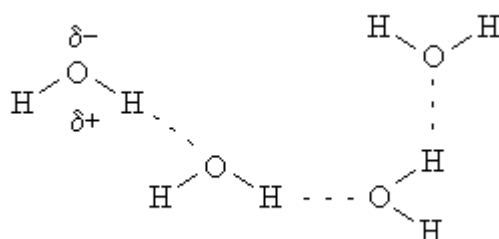


Fig. 5: Legami idrogeno tra molecole d'acqua.

Le frequenze vibrazionali del gruppo O-H delle molecole di acqua sono sensibili all'interazione dell'idrogeno con un terzo atomo, interazione che si stabilisce quando si forma un legame idrogeno. Per questo la spettroscopia infrarossa è un ottimo mezzo per studiare i legami idrogeno.

Nella tabella 1 sono riassunti i principali gruppi funzionali, con le relative frequenze e intensità di assorbimento. Si osserva che l'ossidrilico OH ha un forte assorbimento nella zona a 3600- 3500. La formazione del legame H da parte dell'OH con un terzo atomo, sposta la frequenza di assorbimento verso valori più bassi, 3400. È per questo che la spettroscopia IR ci permette di studiare la distribuzione e la forza dei ponti H.

Gruppo	Classe di Composti	Intervallo, cm ⁻¹	Intensità
C-H	Alcano	2965-2850 (stretch)	forte
	-CH ₃	1450 (bend)	media
		1380 (bend)	media
	-CH ₂	1465	media
Alchene		3095-3010 (stretch)	media
		700-1000 (bend)	forte
	Alchino	3300 circa	forte
	Aldeide	2900-2820	debole
C-C		2775-2700	debole
	Alcano	700-1200 (generalmente non utilizzabile)	debole
	Alchene	1680-1620	variabile
	Alchino	2260-2100	variabile
C=O	Chetone	1715	forte
	Aldeide	1725	forte
	Acido carbossilico	1710	forte
	Estere	1735	forte
	Ammide	1650	forte
	Anidride	1820-1760	forte
C-O	Alcoli, esteri, acidi carbossilici, eteri	1300-1000	forte
O-H	Alcol		
	monomero	3650-3590	variabile e netta
	legato con legame H	3400-3200	forte e allargata
	Acido carbossilico legato con legame H	3300-2500	variabile e allargata
N-H	Ammine primaria e Ammide	3500 (circa) stretch	media
	Ammine secondaria e Ammide	3500 stretch	media
CN	Nitrile	2260-2240	media
C-X	Fluoruro	1400-1000	forte
	Cloruro	800-600	forte
	Bromuro	600-500	forte
	Ioduro	500 (circa)	forte

Tabella 1: principali gruppi funzionali chimici con i valori di frequenza e intensità dei picchi di assorbimento che li caratterizzano, quando sottoposti alla radiazione infrarossa.

Il gruppo ossidrilico O-H è particolarmente interessante perché presente nell'acqua e nell'etanolo, entrambi veicoli dei rimedi omeopatici.

In realtà l'acqua è sì efficace mezzo diluente ma la struttura dell'acqua con un determinato assetto di legami H rimane stabile per 50 fsec.

Invece in presenza di etanolo la geometria delle molecole di acqua si stabilizza in virtù delle sue proprietà chimiche: esso contiene una parte non polare costituita dai gruppi metilico e metilenico che conferisce stabilità alla rete dei legami H dell'acqua, preservandone le caratteristiche nel tempo.

Di fatto ciò che andiamo a studiare, applicando la spettroscopia IR all'omeopatia, sono proprio gli spettri della soluzione idroalcolica (acqua con una certa percentuale di etanolo) e come essi cambiano in funzione del soluto che vi ha transitato (il rimedio omeopatico).

Di seguito gli spettri IR di etanolo, acqua, e di etanolo 30% (fig 6-8) e la struttura di acqua e etanolo (fig 9;10).

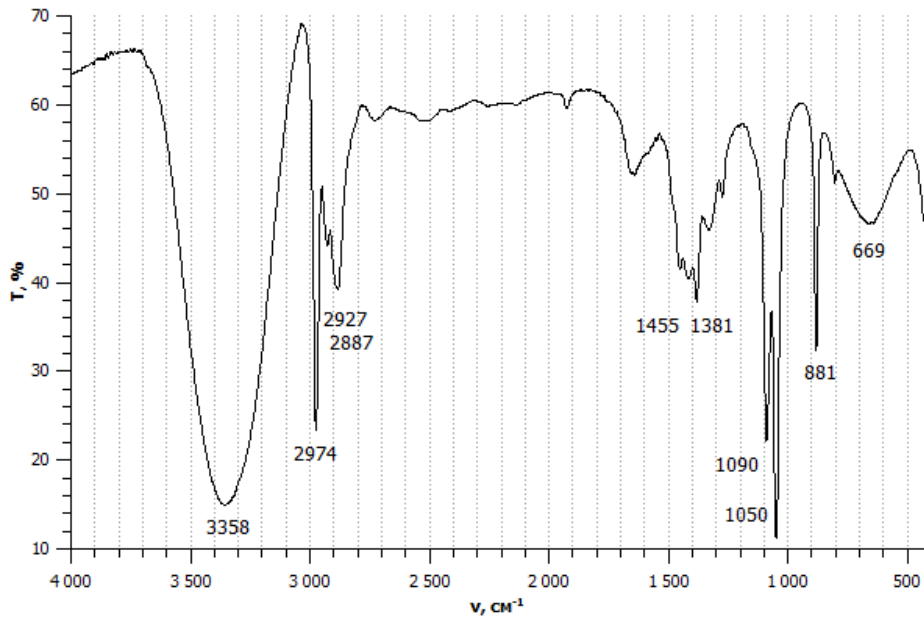


Fig 6 spettro IR dell'etanolo.

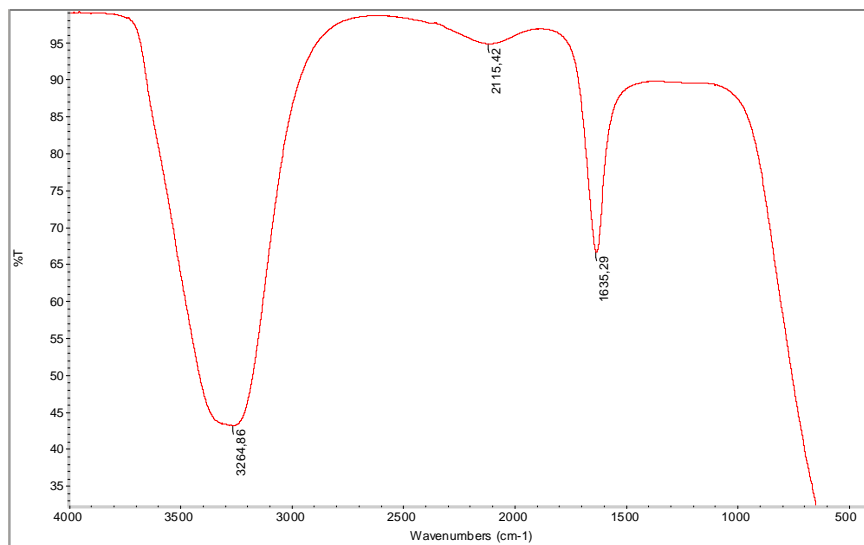


Fig 7 spettro IR dell'acqua.

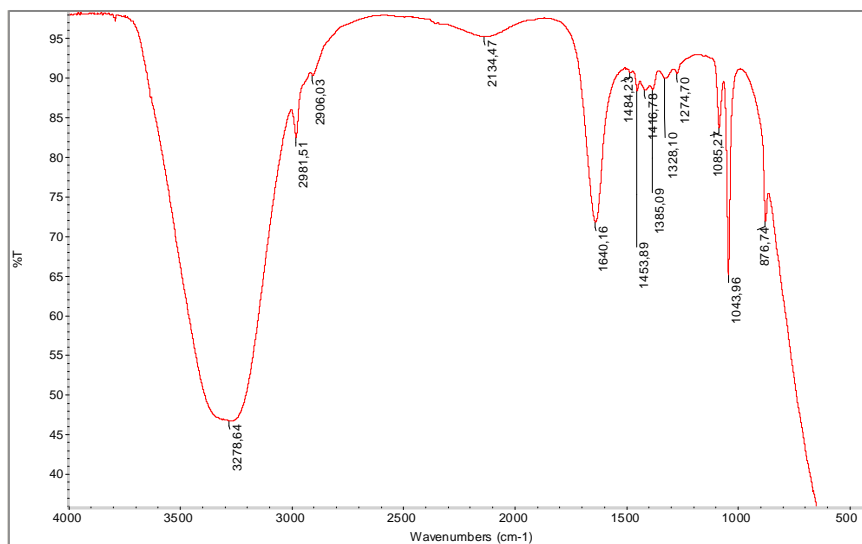


Fig 8 spettro IR dell'etanolo 30%.

Dalle figure è possibile rilevare i picchi caratteristici di acqua e di etanolo.

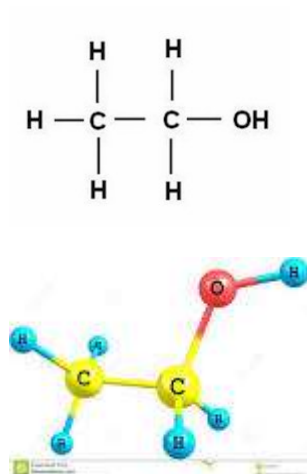


Figura 9: struttura chimica dell'etanolo.

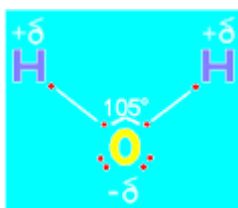


Figura 10: struttura chimica dell'acqua.

Tenendo conto dei gruppi chimici di acqua e etanolo (vedi fig.9 e 10) associamo i picchi della figura ai gruppi funzionali; i valori a sinistra indicano la frequenza vibrazionale dei gruppi chimici, espressa in cm^{-1}):

3500 - 3000	in questa zona assorbe sia l'OH dell'etanolo che quello dell'acqua
2981 – 2900	stiramento CH
1640 - 1630	piegamento OH
1455 – 1450	piegamento OH
1385 - 1380	piegamento OH
1300 - 1000	stiramento CO
1465 - 1450	piegamento CH
1000 - 800	piegamento CH

Di particolare interesse sono i picchi che rappresentano le vibrazioni di piegamento del gruppo OH tra 2000 e 1000 cm^{-1} perché specifici dell'acqua. Invece alla frequenza di 3400 cm^{-1} , assorbono sia gli OH dell'acqua che dell'etanolo.

Studi in letteratura di spettroscopia IR applicata all'omeopatia

Riportiamo qui di seguito un accenno ai principali lavori in letteratura [1, 29-31] [32] [33, 34], nei quali è stata usata la spettroscopia IR applicata all'omeopatia:

Sukul et al., 2001[29]
 Nux vomica 30 prepared with and without succussion shows antialcoholic effect on toads and distinctive molecular association.

I sukul hanno usato uno spettrometro IR (Hitachi, modello 260-10) per ottenere spettri dell'etanolo 90% e di alcuni rimedi omeopatici.

Dallo studio emerge che i medicinali e il loro mezzo diluente mostrano tra loro differenze nei parametri di numero d'onda e intensità di assorbimento delle bande di stiramento e piegamento OH e delle bande di stiramento CH.

Significativi sono i risultati ottenuti dal confronto tra
 etanolo 90%
 nux v 30 CH non succussa
 nux v 30 CH succussa.

Analizzando i risultati, si può dire che i legami idrogeno riducono la frequenza di stiramento dell'ossidrile e di stiramento del gruppo CH.

Gli spostamenti di frequenza della banda OH di rimedi dinamizzati rispetto al mezzo diluente riflettono l'esistenza di un diverso assetto nei legami idrogeno delle due soluzioni.

Lo stesso si può osservare per la banda di stiramento CH, che rappresenta sia i gruppi metilici che metilenici della componente etanolica.

Ciò suggerisce che, nei medicinali dinamizzati, si costituisce una associazione dinamica tra molecole di acqua in forma di polimeri tenuti insieme da legami idrogeno.

Sukul et al., 2005[31]

Variation in Fourier transform infrared spectra of some homeopathic potencies and their diluent media.

Con uno studio pubblicato nel 2005 i Sukul hanno dato evidenza del fatto che spettri infrarossi di diversi rimedi omeopatici e di diverse potenze dello stesso rimedio differiscono tra loro e rispetto allo spettro del solvente di diluizione.

A tal fine hanno usato uno spettroscopio FTIR (Jasco, modello 420), il cui numero d'onda ha risoluzione 4cm⁻¹.

Hanno studiato gli spettri nell'intervallo di numero d'onda 2000 – 1000 cm⁻¹.

Come supporto per il campione sono state usate pastiglie di bromuro di potassio impregnate della potenza omeopatica.

Si è visto che le diverse potenze omeopatiche e il solvente differiscono tra loro nel numero di bande, nella posizione (numero d'onda), nella forma e nell'ampiezza delle stesse.

Le bande prese in esame sono solo quelle dell'intervallo sopraindicato (bande di piegamento) perché in questa zona assorbono solo le vibrazioni di piegamento dei legami OH dell'acqua, e non c'è sovrapposizione con le bande di assorbimento OH dell'alcol.

In questo modo si può studiare come cambia la struttura dell'acqua in funzione del fatto che è venuta a contatto col rimedio.

Le differenze rilevate negli spettri rispecchiano il differente numero di legami idrogeno dell'acqua e la loro differente forza.

Inoltre in questo studio si dà prova di come il granulo usato in omeopatia come supporto per il rimedio sia effettivamente capace di conservare le proprietà della soluzione idroalcolica di partenza. Analogamente infatti il supporto solido impiegato per la registrazione degli spettri IR (KBr) mantiene il suo specifico potere di assorbimento.

I campioni messi a confronto in questo studio sono:

etanolo 90% (matrice)

etanolo 30 CH

nux v 30 CH

lyc 30 CH

santonin 30 CH

cina 30 CH

cina 206 CH

cina 1006 CH.

I risultati fanno emergere che i rimedi sopra indicati differiscono in modo significativo gli uni dagli altri e rispetto al loro mezzo di diluizione per le seguenti caratteristiche delle bande di piegamento :

*numero d'onda (posizione della banda)

*intensità di assorbimento della banda (assorbanza / trasmittanza)

*ampiezza della banda a metà dell'altezza del picco .

In conclusione tutti questi parametri ci dicono che sono diversi da campione a campione il numero di legami idrogeno tra le molecole d'acqua e la distribuzione della loro forza.

2008, Rao et al.

[34]

Characterization of the structure of ultra dilute sols with remarkable biological properties.

Il lavoro di Rao vuol mostrare come per tutti i materiali è la struttura e non la composizione a definire in modo duraturo le proprietà specifiche del materiale stesso.

Un semplice esempio è rappresentato dalla grafite, un materiale inorganico molto duttile che in un millisecondo può essere convertito nel materiale più duro in natura, il diamante, senza che cambi la sua composizione.

Sulla base di questo concetto gli autori mostrano la plausibilità dell'omeopatia, poiché diversi rimedi hanno diverse strutture.

Il suo studio si struttura attraverso le seguenti domande:

è possibile rilevare con metodi analitici la differenza tra un rimedio omeopatico e il suo solvente di partenza?

è possibile rilevare con metodi analitici la differenza tra rimedi omeopatici ottenuti da differenti principi attivi?

è possibile rilevare con metodi analitici la differenza tra diverse potenze dello stesso rimedio omeopatico?

Metodi:

spettroscopia UV VIS

spettroscopia FT-IR

spettroscopia Raman

Campioni usati:

1^a serie:

Nat m 6 12 30C

Nux v 6 12 30C

Alcol 95% (mezzo diluente) succusso

Alcol 95% (mezzo diluente) non succusso

2^aserie :

Carcinosinum 6X 30X CM

Carcinosinum Sample 1, 2 3

Risultati UV

1^a serie

Differenze significative tra gli spettri a confronto dei due rimedi, a parità di potenza.

Differenze significative tra potenze dello stesso rimedio sia per nat m che per nux v.

Differenze significative tra spettro di alcol succusso e non succusso.

Differenze significative tra il rimedio omeopatico e il suo mezzo diluente non succusso, sia per nux vomica che per natrum muriaticum.

2^aserie

Carcinosinum mostra chiare differenze tra le varie potenze (numero e ampiezza dei picchi).

Risultati Raman

1^serie

Numero e ampiezza de picchi differiscono da nux v. a nat m. e a parità di rimedio, cambiando la potenza.

2^serie

Carcinosinum mostra diverso numero e forma dei picchi cambiando la potenza.

Risultati FT-IR

Gli autori sostengono che questa metodica non sia abbastanza sensibile per rilevare le differenze tra le potenze omeopatiche, in base ai seguenti risultati:

1^serie

Gli spettri ottenuti sono sovrapponibili (range 800 -4000 cm^{-1}), fatta eccezione per il picco intorno a 1000 cm^{-1} , del 12 CH.

2^serie

Una differenza significativa solo per carcininum 30X.

Parte sperimentale

Oggetto del presente lavoro è lo studio, con spettroscopia FT – IR, delle bande di assorbimento emesse da etanolo 30% non dinamizzato, gelsemium in diverse potenze omeopatiche e il loro placebo, oscillococcinum 200k e il suo placebo.

Scopo della tesi

La tesi vuole dimostrare che diversi rimedi omeopatici e diverse potenze dello stesso rimedio differiscono tra loro e rispetto al mezzo di diluizione per la differente configurazione che le molecole di acqua assumono nella soluzione idroalcolica, in funzione della distribuzione dei legami H. A tal fine viene impiegata la tecnica analitica della spettroscopia all'infrarosso.

Materiali e metodi

Campioni:

etanolo 30% non dinamizzato	ETOH 30 ND
gelsemium 1CH	G1
etanolo 30% 1CH	placebo G1
gelsemium 2CH	G2
etanolo 30% 2CH	placebo G2
gelsemium 29CH	G29
etanolo 30% 29CH	placebo G29

oscillococcinum 200k oscillo
etanolo 30% 200k placebo oscillo

nota: G1, G2, G29, e oscillococcinum sono diluiti e dinamizzati in etanolo 30%;
tutti i campioni sono forniti dalla ditta Boiron.

Metodo:

gli spettri FT-IR sono registrati a 24° C con uno spettrometro FT-IR (modello Nicolet 380, ditta Thermofisher).

Il potere di risoluzione dello strumento è 0,9 cm^{-1} .

La regione in esame: 4000 – 400 cm^{-1} .

Gli spettri registrati riportano :

in ascissa i numeri di onda per ogni cm (cioè il numero di onde complete, o cicli d'onda, contenute in un cm di lunghezza);

in ordinata la trasmittanza %.

Gli spettri vengono registrati posizionando una goccia del campione (ca. 80 microlitri) sul cristallo in ZnSe (seleniuro di zinco), dell'accessorio ATR (riflettanza totale attenuata).

Prima di acquisire i campioni viene effettuata la lettura del background (BKG), ovvero dell'atmosfera circostante, in modo da sottrarre automaticamente il suo spettro dal software.

Prima di caricare il campione, il cristallo di ZnSe viene pulito con carta imbevuta di etanolo 95% e subito dopo con una goccia del campione in esame.

Per ogni campione si acquisiscono almeno 3 spettri.

Nella serie di esperimenti abbiamo registrato 3 volte (una di seguito all'altra), lo spettro di ciascun campione. Per ogni campione è stata annotato l'orario di acquisizione.

Esempio di sequenza:

Background (solo all'inizio)

ETOH 30 ND
ETOH 30 ND
ETOH 30 ND

oscillococcinum
oscillo
oscillo

placebo oscillo
placebo oscillo
placebo oscillo

ecc.

Risultati

Tutti i valori relativi alla posizione dei picchi (espressa in numeri d'onda) e all'intensità di assorbimento (espressa in trasmittanza %) sono stati riportati in una tabella excel.

Successivamente è stata elaborata la stessa tabella ma solo con i valori di trasmittanza (poichè la posizione dei picchi non cambia in modo rilevante da un rimedio all'altro).

Nella figura sottostante, lo schema dei picchi dei campioni dei quali alcuni sono leggermente modificati come intensità nel confronto tra rimedio omeopatico e suo placebo.

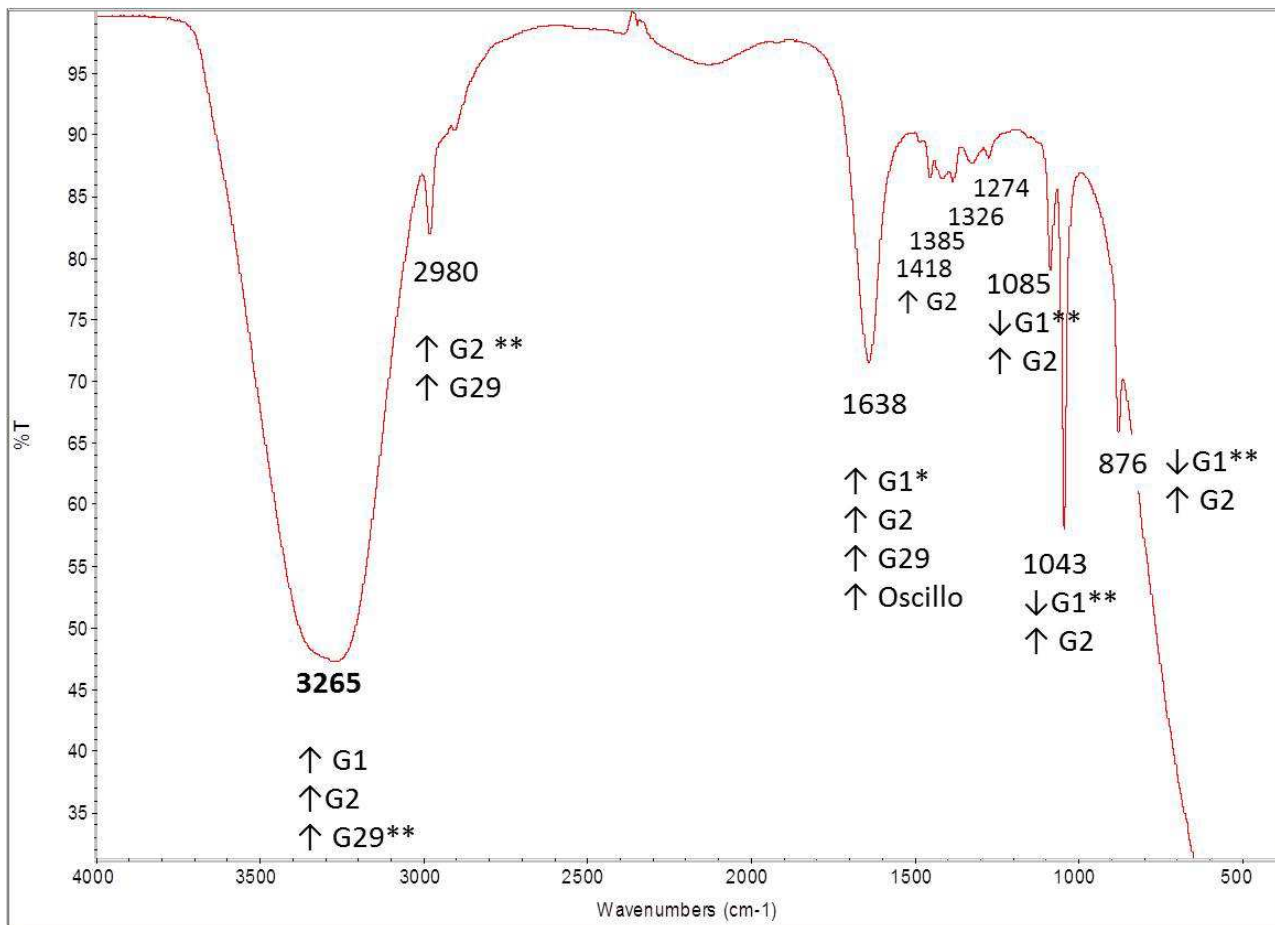
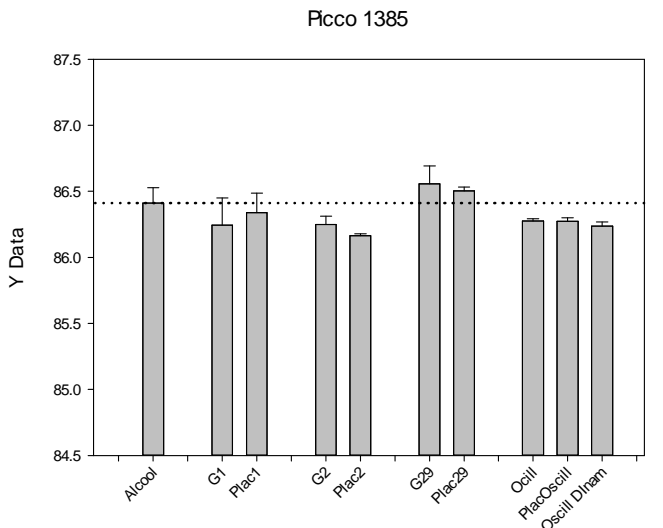
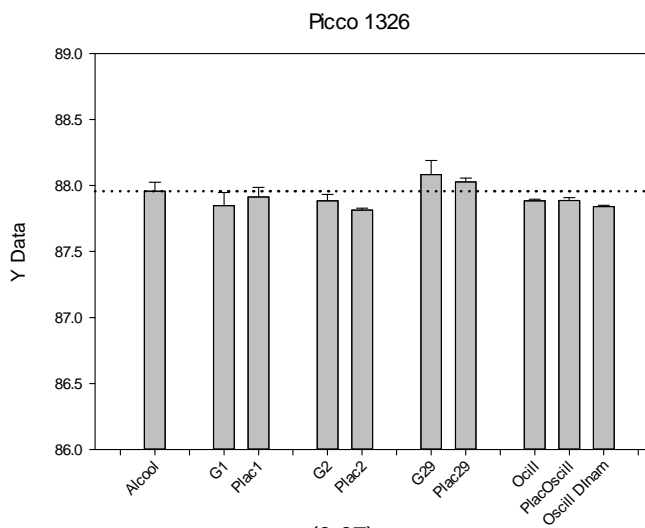
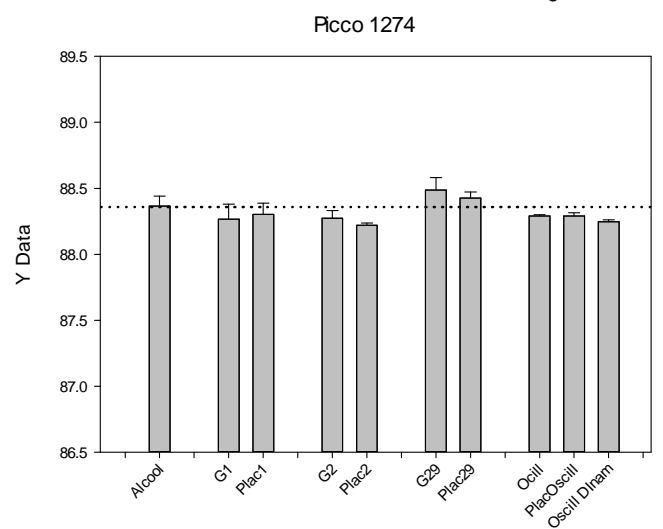
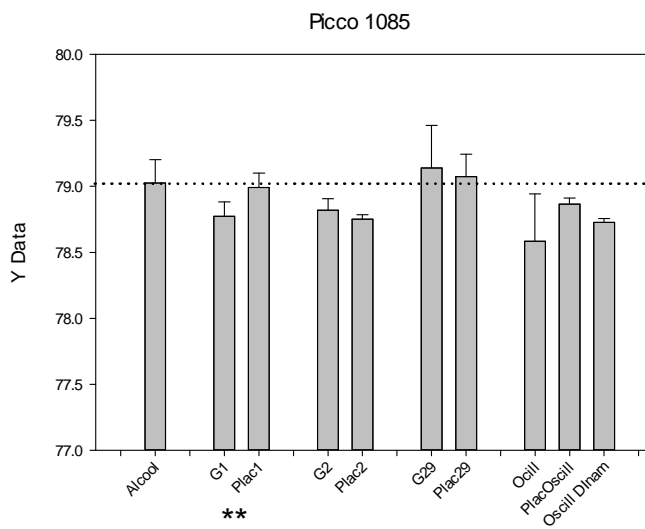
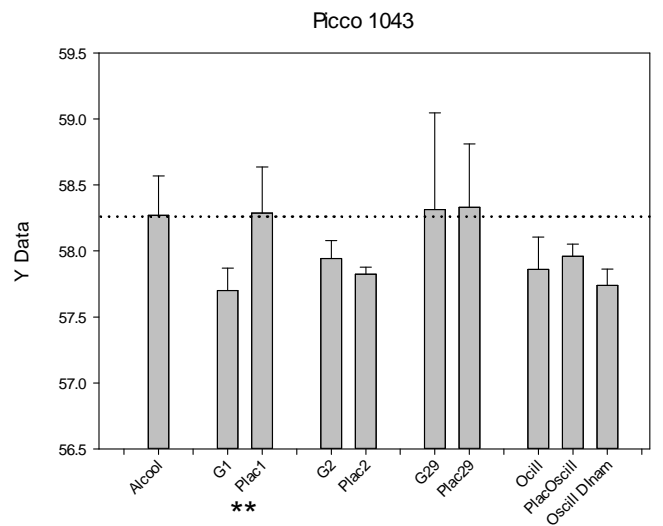
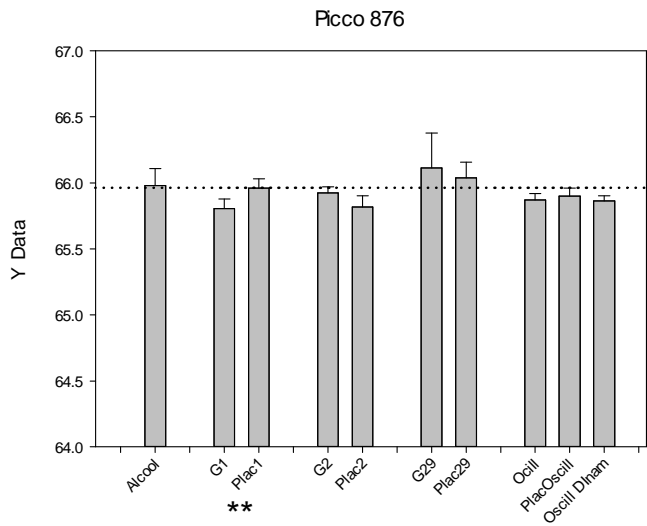


Fig 11 Picchi dello spettro IR, per i quali emergono differenze in termini di altezza del picco, nel confronto tra rimedio e suo placebo.

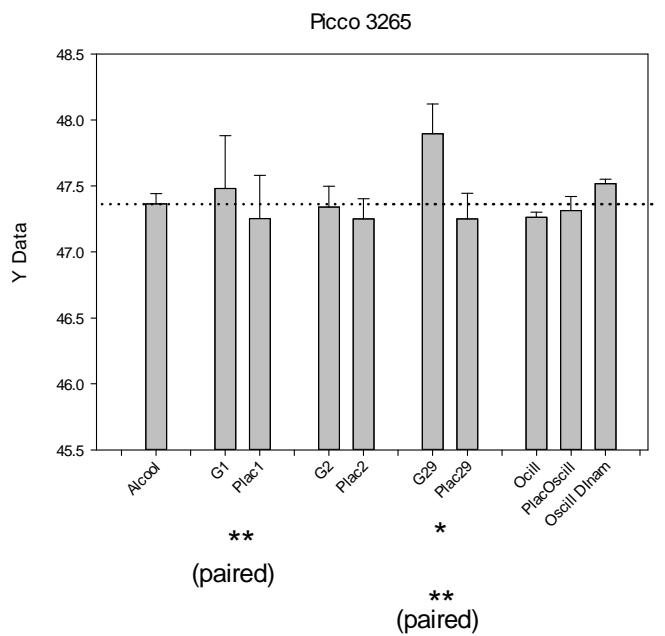
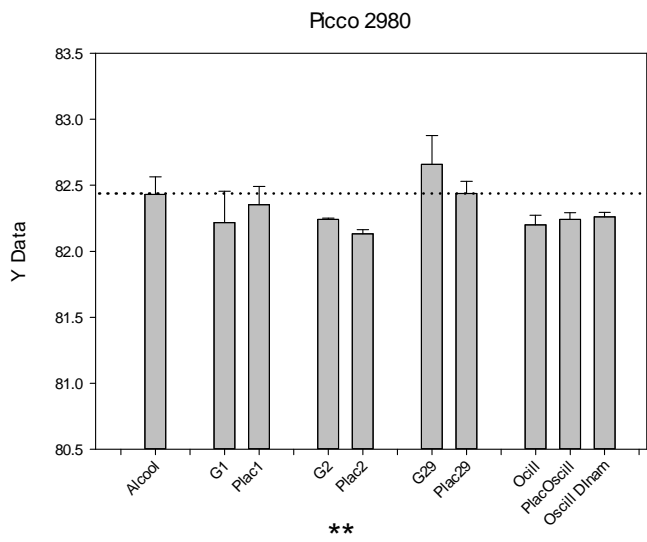
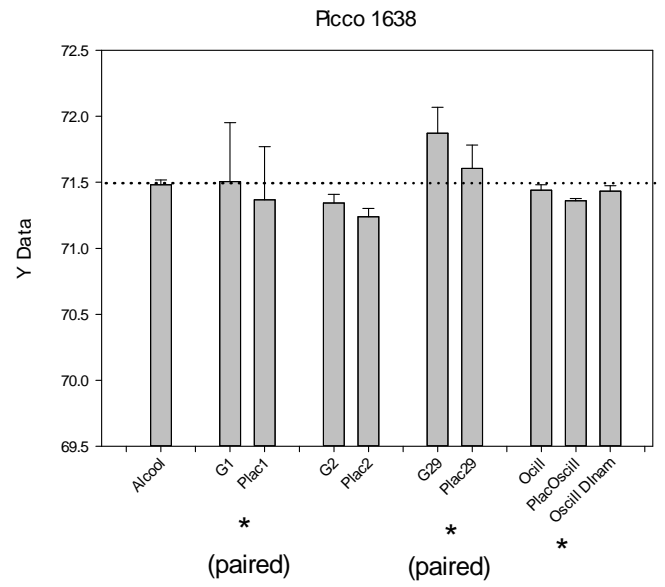
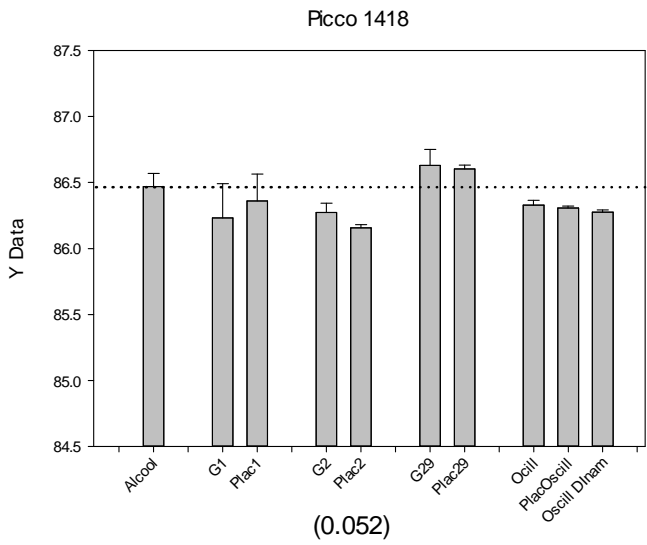
Vengono riportati qui di seguito gli istogrammi dei picchi di interesse (fig 12).

Questi istogrammi rappresentano le medie dei valori di tre diverse determinazioni sugli stessi campi



(0.07)

(0.07)



** $p < 0.01$
 * $p < 0.05$
 (ttest)

130506IRsigmaPlot.JNB
 Pagina2

Fig 12 Istogrammi dei picchi per i quali si sono osservate differenze di intensità, nel confronto tra rimedio e suo placebo.

Le differenze rilevate interessano principalmente i valori di trasmittanza.

Questi dati sono stati elaborati con ANOVA, un test che rileva l'esistenza di differenze significative tra i campioni.

Successivamente è stato fatto un test t, il quale confronta medicinale omeopatico con il suo placebo (tre valori contro tre). Questo test fornisce le significatività statistiche (valori asteriscati).

In alcuni casi in cui il test non era significativo è stato fatto anche il confronto per campioni paralleli: poiché abbiamo fatto tre determinazioni a distanza di tempo, il test parallelo accoppia i test fatti nello stesso momento (esempio: primo test con gelsemium 29 confrontato con primo test con placebo 29, secondo con secondo, terzo con terzo. In tal modo si viene ad annullare il disturbo dovuto al fattore tempo. Quanto più vicine sono le acquisizioni tanto più affidabili sono i risultati, perché lo strumento è molto sensibile e risente dell'aumento e diminuzione dell'anidride carbonica e dell'umidità. Per lo stesso motivo sarebbe meglio ripetere l'acquisizione del background a intervalli ravvicinati, azione che riduce il rumore di fondo.

Come si vede dagli istogrammi, differiscono significativamente :

G1 dal suo placebo nel picco a 876 cm⁻¹, 1043, 1085, 1638 per dati appaiati, 3265 per dati appaiati.

G2 dal suo placebo a 2980.

G29 dal suo placebo a 3265, a 1638 per dati appaiati.

Discussione

La ricerca voleva dimostrare che differenti potenze omeopatiche hanno diversi tipi di "acqua" con diversi legami H, diversi per forza di legame.

La ricerca mirava in primo luogo a verificare lo spostamento delle bande.

Lo spostamento di una banda rappresentativa del gruppo funzionale OH dell'acqua rispecchia una redistribuzione dei legami H. Per esempio un legame H è in grado di aumentare la lunghezza del legame OH originale diminuendo la frequenza di stiramento, cioè la quantità di energia necessaria a provocare una vibrazione di stiramento del legame.

Quello che si è osservato in primo luogo è stato il cambiamento di intensità della banda.

L'intensità di una banda (cioè l'altezza del picco) esprime la probabilità che avvenga la transizione energetica dallo stato fondamentale a quello eccitato (da parte del gruppo funzionale) che provoca l'assorbimento.

L'intensità rispecchia, sebbene in modo indiretto, la distribuzione dei legami idrogeno e della loro forza.

E' importante sottolineare che le molecole all'interno di un campione possono associarsi tra loro attraverso la formazione di legami, in particolare legami idrogeno.

Il legame idrogeno si forma in qualsiasi sistema contenente un gruppo donatore di protoni (es ossidril carbonile ecc) e un gruppo accettore.

Il legame idrogeno modifica la forza di entrambi i gruppi e di conseguenza vengono alterate le frequenze di vibrazione e più in generale si osserva uno spostamento verso frequenze più basse, cosa che porta a bande più intense e allargate.

E' interessante notare che alcuni picchi si modificano solo con le basse diluizioni, mentre altri sia con le basse che con le alte diluizioni (G29 e Oscillococcinum)

Naturalmente questi risultati rappresentano un primo tentativo di natura esplorativa e andrebbero ripetuti con maggiore sistematicità per divenire più consistenti. Sarebbe anche opportuno che in prossime sperimentazioni diversi laboratori utilizzassero lo stesso tipo di strumento e le stesse soluzioni.

Conclusioni

Possiamo concludere che le differenze di intensità osservate nelle bande di vibrazione dei gruppi ossidrilici dell'acqua di potenze omeopatiche diverse sono dovute all'instaurarsi di legami idrogeno, diversi nella forza e nella distribuzione.

Lo spettro IR fornisce una impronta digitale della soluzione idroalcolica venuta a contatto con il soluto, confermando che la struttura cambia, passando dal rimedio al suo placebo. Il solvente conserva memoria del soluto e la traccia che vi rimane rappresenta la qualità e specificità terapeutica dello stesso.

La spettroscopia IR rappresenta quindi una delle tecniche analitiche in grado di avvalorare la teoria della memoria dell'acqua, sebbene non sia la più sensibile.

Ringraziamenti

Ringrazio in modo particolare il prof. Bellavite e il dott. Allegri per il sostegno e l'incoraggiamento che mi hanno offerto, la farmacia Fiorentini dr. Carlo per aver messo a disposizione lo strumento, la scuola di medicina omeopatica di Verona per avermi fatto avvicinare in modo serio e coinvolgente alla disciplina omeopatica.

Bibliografia

1. Sukul NC, Sukul A. High Dilution Effects: Physical and Biochemical Basis, Dordrecht: Kluwer. 2003
2. Anagnostatos GS. Small water clusters clathrates in the preparation process of homeopathy. In: Endler PC, Schulte J eds. Ultra High Dilution. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. 1994: 121-128
3. Gregory JK, Clary DC, Liu K, Brown MG, Saykally RJ. The water dipole moment in water clusters. *Science* 1997; 275:814-817
4. Smith CW. Quanta and coherence effects in water and living systems. *J.Altern.Complement Med.* 2004; 10:69-78
5. Liu K, Brown MG, Carter C, Saykally RJ, Gregory JK, Clary DC. Characterization of a cage form of the water hexamer. *Nature* 1996; 381:501-503
6. Kratky KW. [Homeopathy and structure of water: a physical model]. *Forsch.Komplementarmed.Klass.Naturheilkd.* 2004; 11:24-32
7. Chaplin, M. Water structure and science. <http://www.lsbu.ac.uk/water/index2.html> . 2013.
8. Preparata G. Quantum electrodynamic coherence in matter, Singapore: World Scientific. 1995
9. Arani R, Bono I, Del Giudice E, Preparata G. QED coherence and the thermodynamics of water. *Int.J.Mod.Phys.* 1995; B9:1813-1841
10. Del Giudice E, Galimberti A, Gamberale L, Preparata G. Electrodynamical coherence in water. A possible origin of the tetrahedral coordination. *Mod.Phys.Lett.* 1995; B9:953-961
11. Preparata, G. Regimi coerenti in *Fisica e Biologia*. Il problema della forma. *Biology Forum. Rivista di Biologia / Biology Forum* (90), 434-436. 1997.
12. Del Giudice E, Preparata G, Vitiello G. Water as a free electric dipole laser. *Phys.Rev.Lett.* 1988; 61:1085-1088
13. Del Giudice E, Preparata G. Coherence electrodynamic in water. In: Schulte J, Endler C eds. *Fundamental Research in Ultrahigh Dilution and Homeopathy*. Dordrecht: Kluwer. 1998: 89-100
14. Fesenko EE, Gluvstein AY. Changes in the state of water, induced by radiofrequency electromagnetic fields. *FEBS Lett.* 1995; 367:53-55
15. Temgire MK, Suresh AK, Kane SG, Bellare JR. Establishing the interfacial nano-structure and elemental composition of homeopathic medicines based on inorganic salts: a scientific approach. *Homeopathy* 2016; 105:160-172
16. Bell IR, Schwartz GE. Enhancement of adaptive biological effects by nanotechnology preparation methods in homeopathic medicines. *Homeopathy* 2015; 104:123-138
17. Bellavite P, Marzotto M, Oliosio D, Moratti E, Conforti A. High-dilution effects revisited. 1. Physicochemical aspects. *Homeopathy* 2014; 103:4-21
18. Anick DJ, Ives JA. The silica hypothesis for homeopathy: physical chemistry. *Homeopathy.* 2007; 96:189-195
19. Elia V, Niccoli M. Thermodynamics of extremely diluted aqueous solutions. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999; 879:241-248
20. Elia V, Napoli E, Niccoli M, Nonatelli L, Ramaglia A, Ventimiglia E. New physico-chemical properties of extremely diluted aqueous solutions. A calorimetric and conductivity study at 25°C. *J.Thermal Anal.Calorim.* 2004; 331-342

21. Elia V, Napoli E, Germano R. The 'Memory of Water': an almost deciphered enigma. Dissipative structures in extremely dilute aqueous solutions. *Homeopathy*. 2007; 96:163-169
22. Rey LR. Thermoluminescence of ultra-high dilutions of lithium chloride and sodium chloride. *Physica* 2003; A323:67-74
23. Rey L. Can low-temperature thermoluminescence cast light on the nature of ultra-high dilutions? *Homeopathy*. 2007; 96:170-174
24. Van Wijk R, Bosman S, van Wijk EP. Thermoluminescence in ultra-high dilution research. *J.Altern.Complement Med*. 2006; 12:437-443
25. Bell IR, Lewis DA, Brooks AJ, Lewis SE, Schwartz GE. Gas discharge visualization evaluation of ultramolecular doses of homeopathic medicines under blinded, controlled conditions. *J.Altern.Complement Med*. 2003; 9:25-38
26. Smith RB, Jr., Boericke GW. Modern instrumentation for the evaluation of homeopathic drug structure. *J.Am.Inst.Homeopath*. 1966; 59:263-280
27. Smith RB, Boericke GW. Changes caused by succussion on NMR patterns bioassay of bradykinin triacetate succussions dilutions. *J.Amer.Inst.Hom*. 1968; 61:197-212
28. Demangeat JL. Nanosized solvent superstructures in ultramolecular aqueous dilutions: twenty years' research using water proton NMR relaxation. *Homeopathy*. 2013; 102:87-105
29. Sukul NC, De A, Dutta R, Sukul A, Sinhababu SP. Nux vomica 30 prepared with and without succussion shows antialcoholic effect on toads and distinctive molecular association. *Br.Homeopath.J*. 2001; 90:79-85
30. Sukul A, Sarkar P, Sinhababu SP, Sukul NC. Altered solution structure of alcoholic medium of potentized Nux vomica underlies its antialcoholic effect. *Br.Homeopath.J* 2000; 89:73-77
31. Sukul NC, Ghosh S, Sukul A, Sinhababu SP. Variation in Fourier transform infrared spectra of some homeopathic potencies and their diluent media. *J.Altern.Complement Med*. 2005; 11:807-812
32. Roy R, Tiller W, Bell IR, Hoover MR. The structure of liquid water. Novel insights from materials research; potential relevance to homeopathy. *Mat.Res.Innovat*. 2005; 9:98-103
33. Rao ML, Roy R, Bell IR, Hoover R. The defining role of structure (including epitaxy) in the plausibility of homeopathy. *Homeopathy*. 2007; 96:175-182
34. Rao ML, Roy R, Bell I. Characterization of the structure of ultra dilute sols with remarkable biological properties. *Mater.Lett*. 2008; 62:1487