

Université de Montréal

Caractérisation des nanoparticules polymériques par la technique d'ultracentrifugation analytique

par

Leosveys Diaz

Département de Chimie
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M. Sc.)
en Chimie

Décembre 2014

© Leosveys Diaz, 2014

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation des nanoparticules polymériques par
la technique d'ultracentrifugation analytique**

Présenté par :
Leosveys Diaz

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Suzanne Giasson, présidente-rapporteuse
Kevin J. Wilkinson, directeur de recherche
Patrick Hayes, membre du jury

Résumé

L'utilisation de nanoparticules (NPs) dans divers domaines industriels est de plus en plus fréquente ce qui génère leur propagation dans l'environnement. Selon leur persistance, mobilité, bioaccumulation et toxicité, des risques inconnus pour la santé et pour des écosystèmes peuvent en résulter. En effet, la caractérisation et la quantification sont des défis analytiques très complexes en raison de la nature dynamique (petite taille, grande réactivité et instabilité) des nanomatériaux. L'objectif de cette étude est donc de caractériser par ultracentrifugation analytique (AUC) des nanoparticules polymériques (Alloperse® dites allosphères) qui sont destinées à des fins agricoles. Pour y parvenir, différentes NPs métalliques (argent, quantum dot), oxydes métalliques (dioxyde de titane, oxyde de zinc) et NPs de polystyrène ont d'abord été mesurés par AUC à l'aide des différents systèmes de détection (absorbance, fluorescence et interférence). Dans le cas des allosphères, un grand nombre d'essais préliminaires ont été réalisés afin d'optimiser la vitesse d'ultracentrifugation, le temps d'ultracentrifugation, le nombre de numérisations et la concentration de l'échantillon. Un protocole optimisé a été utilisé pour la détermination du diamètre hydrodynamique (d_H) des NPs. Les différentes analyses qui ont été réalisées dans cette étude révèlent que l'AUC permet de déterminer la taille de très petites NPs. Par ailleurs, une étude du comportement de ces allosphères pour des pH entre 4-8, des forces ioniques de 0 à 500 mM, en présence ou absence de matière organique naturelle a été entreprise. Les travaux ont montré que le d_H était d'environ 7,0 nm avec de petites augmentations à faible pH, ou à très grande force ionique ou dureté. Ces résultats indiquent la grande stabilité physique et chimique des allosphères qui auront, ainsi, une grande mobilité dans les sols. La diffusion de lumière dynamique et la spectroscopie de corrélation de fluorescence ont été utilisées afin de valider les résultats obtenus par l'AUC.

Mots-clés : nanoparticules polymériques, caractérisation, pH, force ionique, dureté, matière organique naturelle, mobilité, sols, ultracentrifugation analytique

Abstract

The use of nanoparticles (NPs) in numerous industrial fields is becoming more common, which increases their propagation in the environment. Their generally unknown persistence, mobility, bioaccumulation and toxicity all contribute to increased risks to human health and to ecosystems. Unfortunately, their characterization and quantification are complex analytical challenges due in large part to their dynamic nature (small size, high reactivity and instability). The objective of this study was to characterize polymeric nanoparticles (Allospere®), which are intended for the dispersion of the nanopesticides using analytical ultracentrifugation (AUC). To achieve this goal, the sizes of various metallic nanoparticles (nAg, QD), metallic oxides (nTiO₂, nZnO) and polystyrene nanoparticles (nPS) were first determined by AUC using different detectors (absorbance, fluorescence and interference). In the case of polymeric nanoparticles, a number of preliminary tests were carried out in order to optimize the speed and duration of the ultracentrifugation, the number of scans and the concentration of the NPs for the determination of their hydrodynamic diameter (d_h). The analysis indicated that the AUC was able to measure the sizes of the smallest nanoparticles. In addition, evaluations of the behavior of these nanoparticles between pH 4-8, ionic strengths from 0 to 500 mM, in the presence and absence of natural organic matter (NOM) showed that they had a d_h of about 7.0 nm with small increases at low pH or for large ionic strengths or hardness. These results strongly demonstrated a high physical and chemical stability of allosphères, which implied that they would have a high mobility in soils. Dynamic light scattering (DLS) and fluorescence correlation spectroscopy (FCS) were used to validate the results obtained by the AUC.

Keywords : polymeric nanoparticles, characterization, pH, ionic strength, hardness, natural organic matter, mobility, soil, analytical ultracentrifugation

Table des matières

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	ix
REMERCIEMENTS	xii
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1 PROBLÉMATIQUE ENVIRONNEMENTALE.....	1
1.2 VOIES DE DISPERSION DES PESTICIDES DANS L'ENVIRONNEMENT	2
1.3 NANOPARTICULES MANUFACTURÉES ET NANOPESTICIDES	4
1.4 TYPES DE NANOPESTICIDES	5
1.5 COMPOSITION CHIMIQUE DES NANOPARTICULES D'ALLOSPERSE®.....	11
1.6 MÉTHODES POUR LA CARACTÉRISATION DES ALLOSPHERES	12
1.7 ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE	14
1.7.1 INSTRUMENTATION	15
1.7.2 FONCTIONNEMENT	17
1.7.3 LES PRINCIPES THÉORIQUES	19
1.8 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	23
CHAPITRE 2 : OPTIMISATION	24
2.1 OPTIMISATION DE L'AUC AVEC LES POINTS QUANTIQUES	24
2.1.1 LIMITE DE DÉTECTION PAR DIFFÉRENTS DÉTECTEURS	24
2.1.2 RÉPÉTABILITÉ	27
2.2 OPTIMISATION DE L'AUC POUR L'ÉTUDE DES ALLOSPHÈRES	28
2.2.1 SÉLECTION DU DÉTECTEUR ET LA LIMITE DE DÉTECTION DES ÉCHANTILLONS	29
2.2.2 OPTIMISATION DU TEMPS DE SÉDIMENTATION	33
2.2.3 SÉLECTION DE LA VITESSE DE SÉDIMENTATION	34

2.2.4 RÉPÉTABILITÉ DES ANALYSES	36
2.3 CONCLUSION	38
CHAPITRE 3: ARTICLE.....	39
PRÉSENTATION DE L'ARTICLE	39
ABSTRACT	40
3.1 INTRODUCTION	41
3.2 MATERIALS AND METHODS	43
3.2.1 REAGENTS AND SOLUTIONS	43
3.2.2 ANALYTICAL ULTRACENTRIFUGATION (SEDIMENTATION VELOCITY)	44
3.2.3 ELECTROPHORETIC MOBILITY (EPM) AND DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS).....	45
3.2.4 FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY (FCS).....	45
3.3 RESULTS AND DISCUSSION	46
3.3.1 SIZE OF ALLOSPHERES	46
3.3.2 EFFECT OF ENVIRONMENTAL PARAMETERS	48
A. EFFECT OF PH	48
B. EFFECT OF IONIC STRENGTH	49
C. EFFECT OF CA	51
D. EFFECT OF NATURAL ORGANIC MATTER	53
3.3.3 ALLOSPHERES IN NATURAL WATERS	57
3.4 ENVIRONMENTAL IMPLICATIONS	58
3.5 ACKNOWLEDGMENTS	59
3.6 SUPPLEMENTARY MATERIAL	60
CHAPITRE 4: CONCLUSION GENERALE.....	76
BIBLIOGRAPHIE.....	77

Liste des tableaux

Tableau 1. Différentes techniques commerciales pour déterminer la taille des particules.....	13
Tableau 2.1. Valeurs des diamètres hydrodynamiques des QD-vert mesurées par interférence et fluorescence	25
Tableau 2.2. Valeurs des moyennes de la distribution de taille des QD-vert ($7,7 \times 10^{-5}$ M), analysés sur 7 jours par AUC.....	27
Tableau 2.3. Moyennes des distributions de taille des QD-vert ($7,7 \times 10^{-5}$ M) des 7 jours d'analyses.....	28
Tableau 2.4. Diamètres hydrodynamiques des nanoparticules d'allosphères remplies avec Nile-Red déterminés par AUC-SV.....	29
Tableau 2.5. Diamètres hydrodynamiques des allosphères (5 mg L^{-1}) obtenus avec les détecteurs d'interférence et de fluorescence.	36
Table 3.1. Hydrodynamic diameters (mean and mode) and electrophoretic mobilities of allospheres.....	49
Table 3.2. Hydrodynamic diameters (means, modes) for the allospheres in the presence of 0, 10, 50, 100 and 500 mM NaCl.....	50
Table 3.3. Hydrodynamic diameters (means, modes) for the allospheres in the presence of 0, 10, 50, 100 and 500 mM CaCl_2	52
Table 3.4. Hydrodynamic diameters (means, modes) for the allospheres in the presence of CaCl_2 (0, 10, 50, 100 and 500 mM) and NOM (5, 10, 15, 20 mg L^{-1}).....	56
Table S1. Nominal and measured particle diameters determined for several aqueous suspensions of nanoparticles (nTiO ₂ , nAg, nZnO, nPS).....	62
Table S2. Hydrodynamic diameters of two fluorescent NM obtained by SV-AUC	66
Table S3. Hydrodynamic diameters of different concentrations (1-5 mg L^{-1}) of polymeric nanoparticles (allospheres) by SV-AUC.....	67
Table S4. Major ions in the two natural waters	75

Liste des figures

Figure 1.1. Processus et voies de dispersion des pesticides dans l'environnement.....	3
Figure 1.2. Classes de nanopesticides en fonction de leur utilisation.....	6
Figure 1.3. Structure des nanocapsules.....	9
Figure 1.4. Nombre d'études publiées pour plusieurs classes de nanoformulations	10
Figure 1.5. Méthode de fabrication des nanocapsules à partir des polymères de PAA	11
Figure 1.6. Fonctionnement des systèmes de détection. a) Absorbance b) Interférence c) Fluorescence	16
Figure 1.7. Principe de la détection de l'ultracentrifugeuse analytique.....	17
Figure 1.8. Les méthodes de base de l'AUC	19
Figure 1.9. Représentation des forces appliquées sur une particule pendant la centrifugation.	20
Figure 2.1. Distribution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules QD-vert mesurés par AUC-SV fluorescence	26
Figure 2.2. Distribution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules QD-vert mesurés par AUC-SV interférence	26
Figure 2.3. Distribution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules allosphères remplies avec Nile-RED (1 mg L ⁻¹).....	30
Figure 2.4. Distribution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules allosphères remplies avec Nile-RED (5 mg L ⁻¹) interférence.....	30
Figure 2.5. Distribution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules allosphères remplies avec Nile-RED (5 mg L ⁻¹) absorbance	31
Figure 2.6. Distribution des diamètres hydrodynamiques des allosphères à 5 mg L ⁻¹	32
Figure 2.7. Distribution des diamètres hydrodynamiques des allosphères à des 1 mg L ⁻¹	33

Figure 2.8. Distribution des diamètres hydrodynamiques des allosphères à différentes concentrations (1 – 5 mg L ⁻¹) mesurées par AUC-SV avec un détecteur d'interférence et une vitesse de sédimentation de (30000 rpm)	35
Figure 2.9. Distribution des diamètres hydrodynamiques des allosphères à différentes concentrations (1 – 5 mg L ⁻¹) mesurées par AUC-SV avec un détecteur d'interférence et une vitesse de sédimentation de (40000 rpm)	35
Figure 2.10 Distribution des diamètres hydrodynamiques des allosphères (5 mg L ⁻¹) mesuré par AUC-SV avec détection en interférence	37
Figure 2.11 Distribution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules allosphères (5 mg L ⁻¹) mesurées par AUC-SV fluorescence	37
Figure 3.1. Hydrodynamic diameters of allospheres (AUC-DLS)	47
Figure 3.2. Hydrodynamic diameters (nm) of the allospheres at 5 mg L ⁻¹ , at ionic strengths (NaCl) of 0, 10, 50, 100 and 500 mM and pH 6.0	51
Figure 3.3. Hydrodynamic diameters (nm) of the allospheres (5 mg L ⁻¹) at CaCl ₂ concentrations of 0, 10, 50, 100 and 500 mM at pH 6.0	53
Figure 3.4. Hydrodynamic diameters of 5 mg L ⁻¹ of the Elliott Soil humic acid (1S102H)	54
Figure 3.5. Hydrodynamic diameters (nm) of the allospheres (5 mg L ⁻¹) in the presence of 0, 10, 50, 100 and 500 mM of CaCl ₂ and 20 mg L ⁻¹ of Elliott-Soil humic acid (1S102H)	57
Figure 3.6. Hydrodynamic diameters (nm) measured by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation for 5 mg L ⁻¹ of allospheres spiked into two natural waters: (a) Des Prairies River and (b) Effluent from a wastewater treatment plant	58
Figure S1A. Raw sedimentation profiles (100 scans) for 1 g L ⁻¹ of a nPS standard (54 nm) in water when measured using interference optics following centrifugation at 20000 rpm	61
Figure S2. Hydrodynamic diameters of nanoparticles (a, b, c, d) determined using SV-AUC with an interference detector	63
Figure S2. Hydrodynamic diameters of nanoparticles (e, f) determined using SV-AUC with an interference detector	64

Figure S3. Hydrodynamic diameter of the nAg as determined by SV-AUC using an absorbance detector	65
Figure S4. Hydrodynamic diameters of several nanoparticles as measured by SV-AUC and fluorescence detection.....	65
Figure S5. Sedimentation coefficients (s) of different concentrations (1-5 mg L ⁻¹) of the polymeric nanoparticles (allospheres) by SV-AUC with interference detection at 40000 rpm	67
Figure S6. Hydrodynamic diameter of the allospheres (5 mg L ⁻¹) obtained by adsorbing 10 ⁻⁷ M of rhodamine 123 to the allospheres prior to measurement by SV-AUC using fluorescence detection.....	68
Figure S7. Raw data of fringes vs. position in the centrifugation cell for 5 mg L ⁻¹ of the allospheres (pH 6.0).....	69
Figure S8. Hydrodynamic diameters of 5 mg L ⁻¹ of the polymeric nanoparticles (allospheres) at different pH (4.0, 5.0, 7.0, 8.0).....	70
Figure S9. Hydrodynamic diameters of 200 mg L ⁻¹ of the polymeric nanoparticles (allospheres) at pH 7.0 and 8.0 as obtained determined by DLS	71
Figure S10. Hydrodynamic diameters of 5 mg L ⁻¹ of the polymeric nanoparticles (allospheres) at pH 6.0 determined by AUC (5000 rpm, RCF = 2016 x g)	71
Figure S11. Hydrodynamic diameters of 5 mg L ⁻¹ of the polymeric nanoparticles (allospheres) at pH 6.0 determined by AUC (40000 rpm, RCF = 129024 x g)	72
Figure S12. Hydrodynamic diameters of 200 mg L ⁻¹ of the polymeric nanoparticles (allospheres) at pH 6.0 determined by AUC (5000 rpm, RCF = 2016 x g)	72
Figure S13. Hydrodynamic diameters of 200 mg L ⁻¹ of the polymeric nanoparticles (allospheres) at pH 6.0 determined by AUC (40000 rpm, RCF = 129024 x g)	73
Figure S14. Autocorrelation curve resulting from the fluorescence intensity fluctuations of 20 mg L ⁻¹ of the Elliot soil humic acid	74

Liste des abréviations, des sigles et des acronymes

Les significations des abréviations utilisées sont données par défaut en français. Pour certaines la signification est donnée en anglais (entre parenthèses).

PAA	Acide polyacrylique
NPs	Nanoparticules
ENP	Nanoparticules manufacturées
nAg	Nanoparticule d'argent
nTiO ₂	Nanoparticules d'oxyde de titane
nCuO	Nanoparticules d'oxyde de cuivre
nSiO ₂	Nanoparticules d'oxyde de silice
nPS	Nanoparticules de polystyrène
COOH	Acide carboxylique
LDH	Doubles couches d'hydroxydes (layered double hydroxides)
TEM	Microscope à transmission électronique (transmission electronic microscope)
AUC	Ultracentrifugation analytique (analytical ultracentrifugation)
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering)
AFM	Microscopie à force atomique (atomic force microscope)
NTA	Analyse de suivi des nanoparticules (nanoparticle tracking analysis)
FFF	Fractionnement par couplage flux force (Field Flow Fractionation)
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique (size exclusion chromatography)
FCS	Spectroscopie de corrélation de fluorescence (fluorescence correlation spectroscopy)
PMT	Tube photomultiplicateur
SV	Vitesse de sédimentation (sedimentation velocity)
SE	Équilibre de sédimentation (sedimentation equilibrium)
QD	Point quantiques
NM	Nanomatériaux (nanomaterials)
rpm	Rotation par minute
<i>g</i>	Force de la gravité

HEPES Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
ANOVA Analyse de variance
 d_h Diamètre hydrodynamique

À mes filles Angelica et Gabriela

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes vifs et sincères remerciements à mon directeur de recherche **Kevin Wilkinson** qui m'a donné l'occasion de travailler sur un sujet faisant partie du domaine de la chimie environnementale. Je vous remercie sincèrement de m'avoir fait profiter de vos connaissances et expériences dans ce domaine, et pour la confiance que vous m'avez témoignée tout au long de mon projet de maîtrise. Vous avez su faire ressortir mes forces et développer mes capacités. Votre esprit critique et scientifique restera pour moi un modèle dans la vie. Merci sincèrement.

J'exprime ma profonde gratitude à **Caroline Peyrot** qui m'a fait bénéficier de ses larges connaissances dans le domaine la chimie environnementale. Je vous remercie pour les nombreuses discussions et interprétations concernant le travail. Je vous remercie sincèrement d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour l'avancement du projet, et de m'avoir donné l'occasion de poser mes questions et exprimer mes idées.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent aussi aux nombreuses personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail: **Dana Simon** pour la transmission de sa connaissance et son infinie amabilité; **Kim Proulx, Philippe El-akl** et **Sébastien Maillette** pour avoir institué et partagé « l'heure du chocolat », en plus de leurs grandes dispositions à m'aider en tout moment. Aussi, mes sincères remerciements à **Houda Al Harrak** pour son soutien inconditionnel et ses encouragements pendant la réalisation de ce travail et aussi aux autres membres du groupe Élise, Trevor, Majid, Ildephonse, Vladimir et Elena.

J'adresse mes profonds remerciements à l'Université de Montréal et au département de chimie pour m'avoir donné cette grande opportunité dans la recherche scientifique.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Problématique environnementale

L'émergence de la nanotechnologie, qui fait référence à la fabrication de matériaux ou de produits de tailles et de structures contrôlées à l'échelle nanométrique (dimension entre 1 et 100 nm), est la conséquence de propriétés physico-chimiques plus avantageuses et uniques d'un matériau que son homologue aux larges dimensions. Ces performances ont en effet permis des avancées et promettent des changements radicaux dans plusieurs domaines de la science et de la technologie (1). Le développement de la nanotechnologie a mené à l'incorporation de nanomatériaux dans une grande variété de produits industriels, tels que les produits pharmaceutiques, cosmétiques, microélectroniques, les revêtements chimiques et alimentaires (2). Un autre secteur d'intérêt est l'agriculture où, à titre d'exemple, des applications de régulateurs de croissance des végétaux, de fertilisants et de pesticides sur la base d'une structure nanoparticulaire pourraient être plus efficaces et durables que les formulations standards utilisées à ce jour (3). Certaines compagnies agrochimiques ont modifié leurs formulations selon deux types de produits : (i) les produits qui contiennent des nanoparticules (NPs) métalliques, des oxydes métalliques et/ou des nanoargiles; (ii) les nanocapsules polymériques qui sont destinées à s'ouvrir sous diverses conditions environnementales (ex. la lumière du soleil, la chaleur ou bien même dans des conditions alcalines spécifiques retrouvées dans les estomacs d'insectes) (4). Au lieu d'utiliser des concentrations élevées et répéter les applications des produits qui peuvent augmenter le potentiel de pollution par la propagation de substances toxiques dans l'environnement (ex. volatilisation lors des traitements à partir du sol ou de la plante, lessivage ou ruissellement lors de précipitations, infiltration vers les eaux souterraines) (5), les agriculteurs peuvent appliquer les nouvelles formulations à des intervalles moins fréquents et limiter la perte d'efficacité de ces produits. Dans ce contexte d'efficacité économique agricole, il est prédit une évolution et une consommation rapides de ces nouvelles nanoformulations dans les prochaines années générant inévitablement de nouveaux défis et risques tant pour l'environnement que pour l'Homme (4). En effet, les NPs peuvent pénétrer dans les cellules humaines en vue de leurs petites tailles et avoir des effets négatifs (6). Parmi les différentes nanoformulations de pesticides à base de polymères, il existe les nanocapsules

qui se composent d'un cœur d'ingrédient actif, qui est une substance chimique sous forme liquide, solide ou sous forme de dispersion moléculaire, enrobé d'une membrane de polymère ou d'un revêtement telle qu'une coquille. Ce type de nanopesticides a une libération plus contrôlée pour garantir la stabilité de l'ingrédient actif. Cependant, la réalisation de nanocapsules qui peuvent maintenir une quantité suffisamment élevée d'ingrédient actif par rapport à la quantité de polymère nécessaire pour former cette structure « coeur-coquille » présente actuellement un défi (4). De plus, il existe peu d'études disponibles sur l'efficacité des capsules de taille nanométrique. Certaines entreprises ont développé des nanocapsules polymériques, tels que les Allosperse[®] (dites allosphères) qui sont constituées principalement d'acide polyacrylique (PAA) et ont une grande stabilité en solutions aqueuses (7, 8). Certes, leur comportement dans l'écosystème est encore mal connu à ce jour.

Au cours de ces dernières années, le développement des techniques analytiques valides pour la détection, la caractérisation et la quantification des NPs dans les milieux environnementaux présente un grand défi. Il est très difficile de vérifier la concentration et l'état des NPs une fois qu'elles sont libérées dans l'écosystème afin d'évaluer leurs risques du fait de leurs faibles concentrations (< ppb) et de leurs tailles (9). Aussi, il n'est pas clair si les réglementations actuelles sont adéquates pour maîtriser les effets et le devenir possible de ces NPs dans l'environnement (4). Ce défi analytique et l'utilisation croissante des nanocapsules dans les pratiques agricoles rendent la compréhension du comportement de ces NPs et l'étude de leurs risques essentiels afin de mieux gérer leur utilisation.

1.2 Voies de dispersion des pesticides dans l'environnement

Les pesticides sont des produits chimiques utilisés pour éliminer ou contrôler un nombre de parasites qui peuvent endommager les cultures agricoles et réduire leur productivité (10). Les pesticides les plus couramment appliqués sont des insecticides (pour tuer les insectes), des herbicides (pour tuer les mauvaises herbes), des rodenticides (pour tuer les rongeurs) et des fongicides (contre les champignons et les moisissures). Tous ces produits sont largement utilisés dans l'agriculture et ils peuvent provoquer des risques pour l'Homme et pour l'environnement. Plusieurs efforts sont donc en cours afin de trouver des solutions pour réduire leurs effets nocifs.

Des nouveaux produits (structure, forme, composition, etc.) avec une plus grande efficacité, ont été formulés y compris les nanopesticides qui sont des produits phytosanitaires de diamètre de 1 à 1000 nm. Ces composés ont de nouvelles propriétés associées à leur taille telle qu'une plus grande efficacité, une bonne durabilité et une réduction dans les quantités nécessaires de l'ingrédient actif (3, 4).

La répartition des pesticides entre les différents compartiments de l'environnement (air, eau, sol et êtres vivants, Figure 1.1) dépend des propriétés physico-chimiques du composé (constante de solubilité, tension de vapeur ...) ainsi que du milieu (température de l'air, de l'eau, structure du sol, etc.) (11). Cependant, la distribution entre le sol, le feuillage de la plante, les résidus de la culture et des pertes vers l'environnement sera en proportion variable selon le stade de la culture, la formulation utilisée, la cible, la technique d'application et les conditions météorologiques (12). Parmi les différents compartiments, le sol occupe donc la position centrale dans le devenir des pesticides dans l'environnement, en raison de ses applications directes ou indirectes. Le comportement des pesticides dans le sol est soumis à un ensemble de processus qui sont dirigés par une grande diversité de facteurs (13).

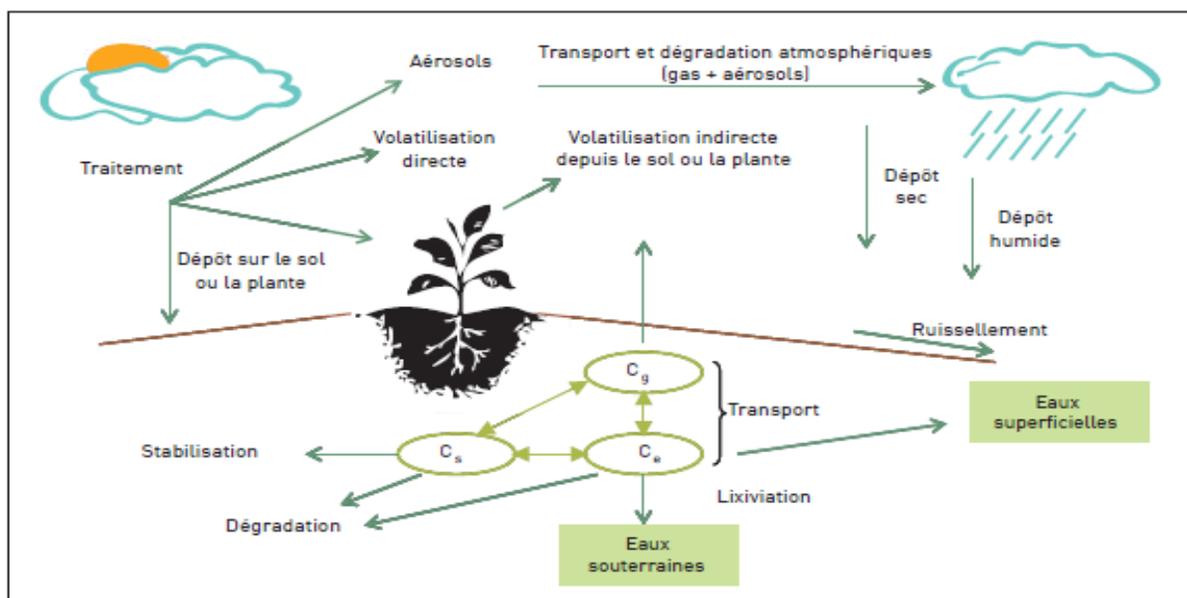


Figure 1.1. Processus et voies de dispersion des pesticides dans l'environnement. Tiré de Blanchoud1 *et al.* 2011 (13). La concentration du pesticide dans la solution, dans la phase solide et dans la phase gazeuse est notée par C_e , C_s et C_g respectivement.

Parmi les importants phénomènes, les molécules de pesticides s'adsorbent plus facilement aux particules du sol qui sont riches en argile ou en matière organique. Dans ce cas, les pesticides deviennent moins susceptibles de se vaporiser ou de migrer dans le sol et ils sont plus accumulés par les plantes. Les pesticides peuvent être transformés d'un état solide ou liquide à un état gazeux (*i.e.* la volatilisation). Ce phénomène peut être accéléré par le climat chaud ou venteux et les pesticides peuvent se disperser dans l'atmosphère et endommager les cultures voisines ou contaminer des grandes zones. Ainsi, les surfaces inclinées provoquent l'entraînement des pesticides dans l'eau (*i.e.* par ruissellement). Par ailleurs, l'entraînement des pesticides par l'eau peut causer leur infiltration dans le sol. Les plantes et les microorganismes peuvent assimiler les pesticides et les dégrader. De même, ils peuvent être dégradés par des réactions photochimiques. Selon les conditions environnementales et les caractéristiques physico-chimiques du pesticide, la dégradation peut durer de quelques heures à plusieurs années.

1.3 Nanoparticules manufacturées et nanopesticides

Les nanoparticules manufacturées (ENP) sont un groupe diversifié de colloïdes synthétiques (diamètre de 1 à 100 nm) qui ont une grande proportion de leurs atomes à la surface de la particule (14). En effet, elles sont utilisées dans de nombreux secteurs industriels grâce à leur réactivité accrue par rapport aux matériaux de taille conventionnelle. L'industrie des pesticides est un domaine où l'utilisation des ENP a augmenté au cours des dernières années (3). À titre d'exemple, les nanoparticules d'argent (nAg) sont utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes (15, 16) et des nanocapsules sont utilisées pour améliorer la mobilité et le rendement des ingrédients actifs. On s'attend donc à ce que la nanotechnologie apporte plusieurs avantages à l'agriculture au cours des prochaines années (3, 17). L'utilisation de nouveaux produits à base de ENP pourrait être reliée à des systèmes de capteurs sans fil qui seraient capables de détecter et de localiser une infestation par pathogènes de plantes cultivées et de déclencher l'application de pesticides selon le besoin.

Le comportement des nanopesticides et des pesticides dans les environnements terrestres et aquatiques est très complexe. En effet, les molécules peuvent subir une gamme de

transformations chimiques et le devenir de ces produits est encore mal compris. La quantification de la partie soluble du pesticide est la plus importante pour comprendre leur transport et leur biodisponibilité (4). L'absorption, l'adsorption et la toxicité des nanopesticides dépendent de la concentration des particules et de leur distribution de taille et de la nature de l'ingrédient actif (18-20). Il est important de noter que la dispersion des nanopesticides peut aussi varier dans le temps selon leur stabilité physicochimique (agglomération, agrégation) qui dépend des facteurs environnementaux tels que le pH et la force ionique. En effet, dus à leur nature colloïdale, ces systèmes ne sont pas toujours à l'équilibre (21). Par conséquent, l'adaptation des méthodologies existantes et le développement des méthodes supplémentaires pour la détection, la quantification et la caractérisation de nanopesticides (ou ENP en général) dans les eaux, les sols et les organismes vivants représentent un grand défi. Pour l'instant, les études sur leur devenir et leurs effets n'ont pas été validées par des évaluations des risques écologiques. De même, leurs faibles concentrations dans l'environnement et la complexité des matrices environnementales rendent difficile leur détection.

1.4 Types de nanopesticides

Le développement de nouvelles formulations à partir d'agents tensioactifs, de polymères et de NPs métalliques et l'élaboration de nouvelles méthodes de stabilisation font l'objet d'investigations intensives (4). Le rôle des ENP est: (i) d'augmenter la solubilité apparente de l'ingrédient actif qui est peu soluble; (ii) de libérer d'une manière lente et contrôlée l'ingrédient actif et/ou (iii) de protéger l'ingrédient actif contre la dégradation prématurée et de le stabiliser quand il rentre en contact avec la solution du sol. La Figure 1.2 présente les principales classes de nanopesticides. Selon cette figure, les nanopesticides peuvent être organisés en trois groupes, avec chaque groupe contenant plusieurs sous-groupes :

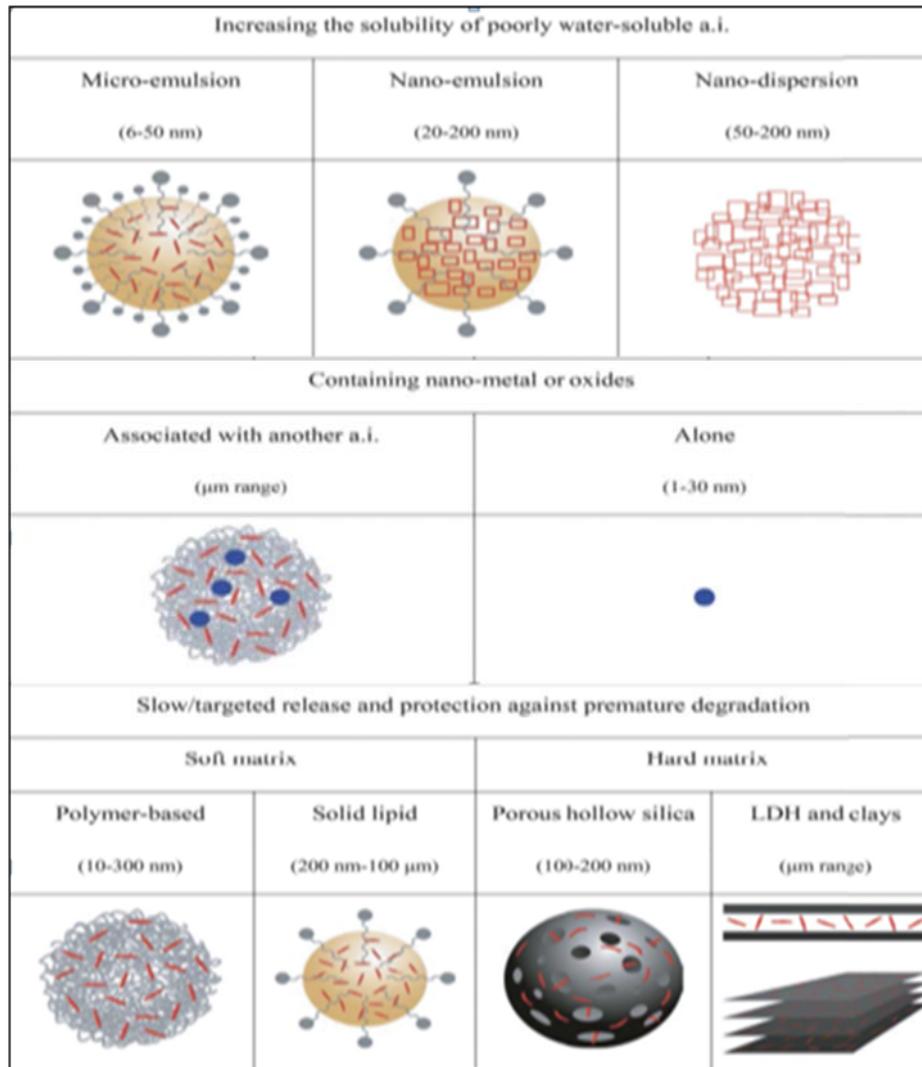


Figure 1.2. Classes de nanopesticides en fonction de leur utilisation. L'ingrédient actif est noté par « a.i » et les doubles couches d'hydroxydes (*layered double hydroxides*) par « LDH ». Tiré de Kah *et al.* 2013 (4).

Le premier groupe de composés dans la Figure 1.2 sont des nanovecteurs qui ont des propriétés physicochimiques favorisant la solubilité de l'ingrédient actif. Cette solubilité aura une incidence sur le devenir, le transport et la biodisponibilité des pesticides. En effet, une augmentation de la solubilité de l'ingrédient actif pourrait améliorer la mobilité des pesticides et augmenter la vitesse de leur dégradation par les microorganismes du sol (4). La stabilité des nanovecteurs suivant leur application est donc le facteur clé de ces nouvelles formulations.

Il existe trois classes de nanopesticides dans ce groupe:

(i) Les microémulsions sont des systèmes généralement constituées d'eau, d'un mélange de l'ingrédient actif dissous dans l'huile, d'un tensioactif solubilisant et d'un co-surfactant (4). Il existe diverses méthodes de formulation, mais elles sont toutes basées sur la constitution d'un diagramme de phase tertiaire. Due à leur composition, il est assez difficile de mesurer leur distribution de taille ou d'avoir de l'information sur leur évolution dans le temps (4). À cause des faibles concentrations des phases dispersées, il existe peu de techniques spectroscopiques qui sont appropriées pour la détermination de la microstructure des microémulsions (22,23). De même

(ii) Les nanoémulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables constituées de deux liquides non miscibles, (un des liquides est dispersé dans l'autre liquide). Leur préparation exige des méthodes non conventionnelles et l'obtention de tailles uniformes et extrêmement petites (entre 20 et 200 nm) a contribué à son succès dans les applications en industrie pharmaceutiques (24). Les nanoémulsions sont métastables (grande stabilité cinétique), optiquement transparentes, de faible viscosité et avec une tendance à se séparer dans leurs phases constitutives. En général, le procédé de préparation est important pour le contrôle de la structure et de la taille (25). Ainsi, cela est souvent responsable des différences entre les nanoémulsions et les microémulsions. De nouvelles formulations de nanoémulsions sont proposées quotidiennement pour l'utilisation avec les pesticides. À titre d'exemple, Tadros *et al.*(26) ont proposé trois méthodes de préparation des nanoémulsions afin d'améliorer la stabilisation et la pénétration de l'ingrédient actif. Cependant, le comportement des nanoémulsions dans l'environnement est méconnu (4).

(iii) Les nanodispersions sont constituées de nanocristaux qui sont fabriqués pour maximiser l'aire de surface, ce qui a pour effet d'augmenter la vitesse de dissolution et la solubilité de l'ingrédient actif. Les nanodispersions sont thermodynamiquement instables et ils nécessitent un apport énergétique fort pour maintenir leur stabilité durant de longues périodes de temps (27). Cette stabilisation reste un défi et nécessite parfois l'ajout de surfactants ou de stabilisants polymères.

Le deuxième groupe de composés dans la Figure 1.2 est constitué de deux sous-groupes, qui sont conçus pour la libération lente de l'ingrédient actif en le protégeant d'une dégradation prématurée. Ceci aura l'effet de réduire le taux d'application puisque la formule restera biologiquement active plus longtemps que les autres formulations de pesticides. Cela pourrait éventuellement devenir un inconvénient pour l'environnement.

Deux sous-groupes sont identifiés selon deux conditions; soit les NPs inorganiques et l'ingrédient actif sont seuls soit elles sont associées entre eux dans des grands hétéroagrégats:

(i) Des nanoparticules inorganiques (métalliques ou oxydes métalliques) jouant le rôle d'ingrédient actifs comme par exemple nAg, dioxyde de titane ($n\text{TiO}_2$) ou oxyde de cuivre ($n\text{CuO}$). Plus précisément, les nAg, utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes, ont montré leur capacité d'inhiber de manière significative la croissance de pathogènes visant les plantes (28).

(ii) Des nanoparticules inorganiques (métalliques ou oxydes métalliques) associées à un ingrédient actif et souvent conçues dans une matrice de polymère (28). Par exemple, des ENP mésoporeuse de dioxyde de silice ($n\text{SiO}_2$) ont été suggérées comme vecteurs potentiels pour l'adsorption des pesticides pour contrôler les ravageurs agricoles. Néanmoins, il existe peu d'études qui ont démontré ce potentiel (28). Aussi, des études récentes ont montré que ces nouvelles formulations sont plus efficaces que l'ingrédient actif pur pour libérer celui-ci d'une manière contrôlée et ainsi réguler la croissance des plantes (28).

Finalement, le troisième groupe de composés de la Figure 1.2 sont des « nanotransporteurs » qui libèrent l'ingrédient actif au fil du temps. Il existe quatre classes de nanomatériaux dans ce groupe :

(i) Les nanoparticules lipidiques solides sont constituées de lipides qui restent solides à température ambiante. Cette matrice, plus ou moins cristallisée, est stabilisée par une couche de surfactants. Mathius *et al.* (29) ont démontré que ces nanoformulations étaient constituées par des particules d'une large gamme de tailles (200 nm à 100 microns) et qu'une très grande énergie était nécessaire pour les homogénéiser (4).

(ii) Les nanoparticules creuses poreuses sont constituées essentiellement de $n\text{SiO}_2$ avec des diamètres de 100 à 200 nm, leur conférant une aire de surface élevée et deux surfaces qui

peuvent être fonctionnalisées (interne et externe). Elles ont une bonne résistance mécanique, stabilité chimique, biocompatibilité et versatilité synthétique (30). Elles peuvent être utilisées pour libérer des pesticides de manière contrôlée (influencée par la température, le pH et l'épaisseur des NPs) (31).

(iii) Les doubles couches d'hydroxydes (LDH) et les argiles sont des composés nanostructurés sous forme de couches ou de feuillets empilés. Ces nanomatériaux ont des atomes fortement liés entre eux dans deux directions de l'espace, formant des plaques laminées (planes). Ils sont aussi faiblement liés dans la direction perpendiculaire (32). L'ingrédient actif est adsorbé à l'intérieur des NPs, entre les feuillets. Divers produits agrochimiques, de libération lente ou contrôlée, ont été développés avec ce type de formulation. Des études réalisées par Park *et al.* (2010) ont démontré que grâce à leur rétention prolongée dans le sol, ils ont un énorme potentiel pour transporter les antibiotiques (33). Une autre étude réalisée par Quin *et al.* (2009) a démontré que la libération de l'ingrédient actif dépendait en grande partie de la température, du pH et de la présence d'électrolytes (34).

(iv) La microencapsulation ou nanoencapsulation est utilisée pour enrober des pesticides par un polymère de taille nanométrique ou micrométrique. Dans ce cas, l'ingrédient actif est protégée dans le noyau des nanoformulations contre les conditions environnementales (lumière, humidité, oxygène) (Figure 1.3) (35) . La libération contrôlée résulte des effets du solvant, de la diffusion ou suivant la dissolution ou la rupture de la nanocapsule.

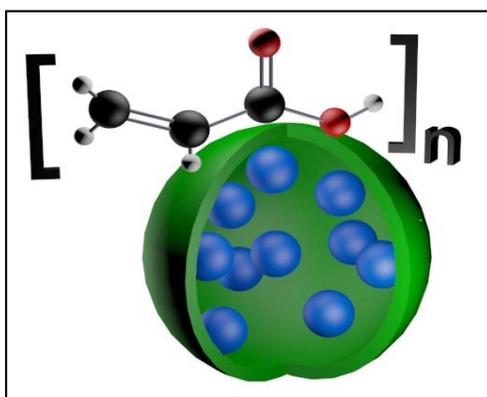


Figure 1.3. Structure des nanocapsules

Différents matériaux sont utilisés comme agents d'encapsulation tels que les polysaccharides (y compris la cellulose et ses dérivés), les lipides et les protéines. Ces

nanocapsules, avec une grande stabilité colloïdale, sont en tête de lice pour le développement des nanopesticides futurs (36). L'ingrédient actif est absorbé par la capsule ce qui résulte en une réduction de la phytotoxicité du produit, due surtout à une distribution plus homogène du pesticide dans l'environnement (4). Cependant, les quantités d'ingrédient actif dans la structure de la nanocapsule et les vitesses de libération des capsules sont actuellement méconnues. De même, certaines nanocapsules ont une capacité limitée à protéger le pesticide contre l'oxydation.

Les principales nanoformulations se retrouvant dans la littérature scientifique depuis les dernières années ont été résumées dans la Figure 1.4 (28).

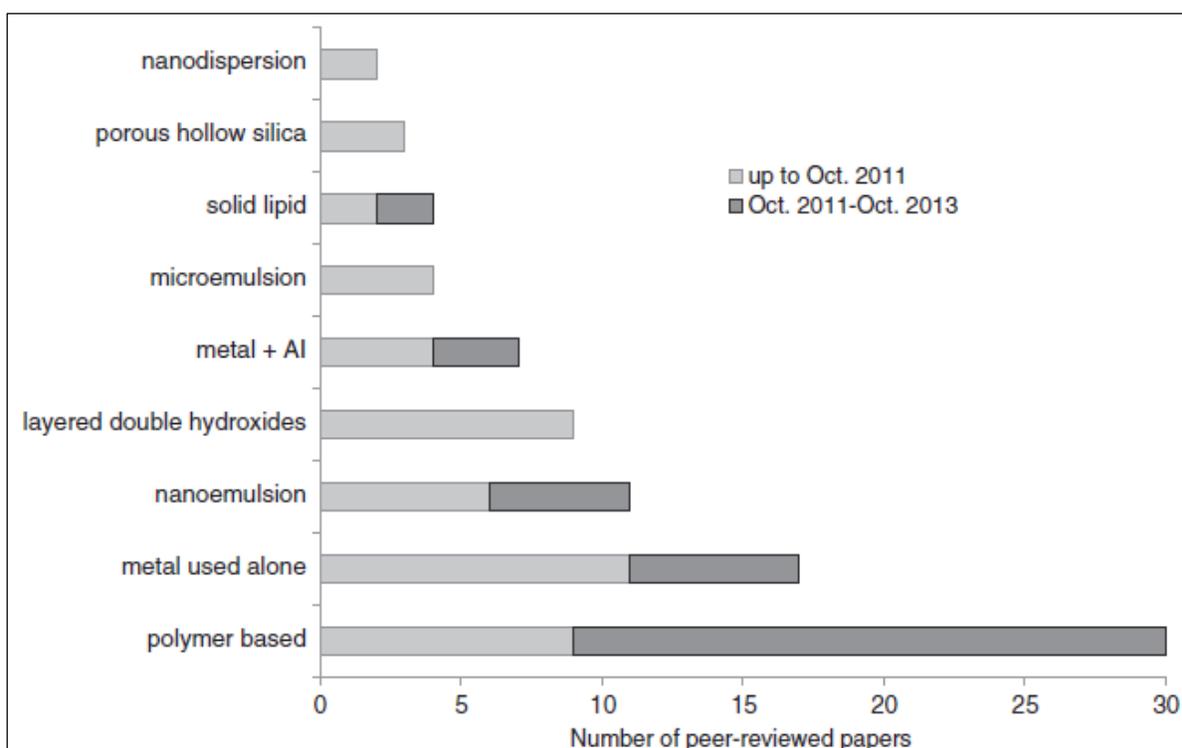


Figure 1.4. Nombre d'études publiées pour plusieurs classes de nanoformulations. Tiré de (Kah *et al.* 2014 (28)).

1.5 Composition chimique des nanoparticules d'Alloperse®

Les allosphères (Alloperse®) sont des nanocapsules destinées à des fins agricoles, fabriquées par l'entreprise Vive Crop Protection. L'objectif de la compagnie est de développer des nanocapsules qui sont plus efficaces et moins nocives pour l'environnement. La méthode de production de ces nanocapsules est présentée dans la Figure 1.5.

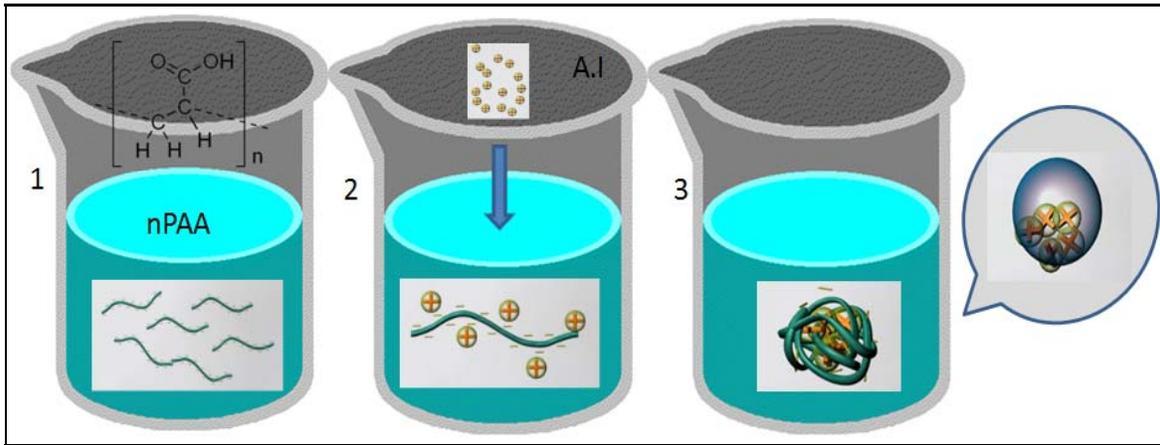


Figure 1.5. Méthode de fabrication des nanocapsules à partir des polymères de PAA.
Modifié de www.vivecrop.com.

Les trois étapes de fabrication des allosphères sont: (1) la solubilisation du PAA; (2) l'agrégation du polymère par l'ingrédient actif, qui est chargé positivement et (3) la réticulation du polymère. En effet, les allosphères sont hydrophiles à l'extérieur (absorbent l'eau) et oléophiles à l'intérieur (absorbent les corps gras). La réticulation se réalise en insérant l'ingrédient actif qui est oléophile dans la nanoparticule avant l'application.

Le PAA est un polyélectrolyte constitué par des groupements d'acide carboxylique (COOH) ionisable ($pK_a = 4,5-5$) (37). La protonation ou la déprotonation de l'acide polyacrylique dépend du pH selon l'équation (1) :



où "R" représente la chaîne du PAA. La déprotonation de la chaîne conduit au développement d'une répulsion électrostatique intramoléculaire, qui résulte en un allongement de la chaîne. Quoique le polymère puisse prendre différentes conformations (étirée ou enroulée), dans les conditions environnementales, c'est rare de trouver un pH qui est inférieur à son pKa. Par conséquent, dans l'environnement, l'allosphère sera typiquement chargée négativement. Vive Crop Protection font réagir le PAA pour augmenter sa réticulation et ainsi sa stabilité.

1.6 Méthodes pour la caractérisation des allosphères

Plusieurs techniques expérimentales modernes et complémentaires sont utilisées pour la détection, la caractérisation et la quantification des NPs. Puisque les méthodes sont basées sur différents principes fondamentaux (Tableau 1), il est nécessaire de choisir la technique la plus adéquate pour analyser les nanomatériaux sur la base de la réactivité des échantillons, de leur nature chimique, de leur concentration et de leur taille. Par exemple, il existe différentes techniques microscopiques pour observer des NPs et pour quantifier leur composition élémentaire et leur structure. La microscopie à force atomique (AFM) a même la capacité de mesurer les forces interparticulaires ou estimer les potentiels de surface des NPs. Cependant, pour pouvoir utiliser les NPs, elles doivent être fixées à un substrat, ce qui n'est pas toujours possible pour les échantillons aqueux (38). La détection des NPs par la microscopie de transmission électronique (TEM) n'est possible que pour des NPs avec une taille et une densité électronique suffisante.

Tableau 1. Différentes techniques commerciales pour déterminer la taille des particules (Modifié de (39, 40)). Les tailles représentatives sont données comme indication seulement (puisqu'elles dépendent de la nature de l'échantillon et de sa concentration).

Technique	Range	Base physico-chimique	Les problèmes courants
Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	0.7 nm-7 μ m	Basé sur le mouvement brownien des particules dans un fluide ; Excellent pour distributions monodisperses; L'autocorrélation du déplacement Doppler de l'intensité de la lumière diffusée est déterminée.	Les grosses particules et agrégats peuvent facilement masquer les petits.
Ultracentrifugation analytique, la sédimentation (AUC)	1 nm- 200 nm	Application d'un grand champ de force centrifuge, qui provoque des molécules de soluté qui peuvent être sédimenter. Bon pour de larges distributions de taille.	Doit connaître la densité des particules, le volume spécifique partiel et le coefficient de friction, l'analyse peut-être complexe.
AFM	0.5 nm- qq μ m	Forces entre le substrat (dans notre cas, le mica), la pointe de l'AFM et la nanoparticule. Bonne résolution, l'imagerie 3D topologique.	Nombre d'échantillon faible, les échantillons doivent être joints à l'appui afin d'être observés.
TEM	0.5 nm- qq μ m	La densité d'électrons de particules. Une bonne résolution d'image.	Préparation de l'échantillon difficile et travail sous vide. Long, coûteux.
Suivi de nanoparticules analyse (NTA)	30nm -300 nm	Suivi d'une particule de lumière diffusée en raison du mouvement brownien.	Similaire à DLS, sauf que les particules sont suivies individuellement. Certains masquages de petites particules.
Fractionnement par couplage Flux-Force (FFF)	2 nm- 2 μ m	Séparation à haute résolution des composés selon leurs tailles et leurs masses, en fonction de la densité, de la composition chimique ou d'autres propriétés.	Doit être combiné avec d'autres détecteurs pour évaluer la taille.
Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	5 nm- 2 μ m	Technique de séparation des macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique.	Lente, nécessite une bonne calibration.
Spectroscopie par corrélation de fluorescence (FCS)	1nm- 200 nm	Mesure du temps de diffusion à travers un petit volume calibré.	Marquage fluorescent des particules est requis ; Concentrations de particules qui peuvent être analysées est limitées.

En général, chaque technique a ses propres limites selon la taille et selon la concentration des NPs qui peuvent être détectées. Il est donc très pertinent de développer d'autres techniques où de coupler des techniques analytiques afin de caractériser des NPs avec plus de précision et plus d'exactitude dans les conditions environnementales. Il est à noter que plusieurs méthodes ont été testées pour la caractérisation des allosphères ou pour élucider leur interaction avec d'autres substances. Par exemple, la formation des complexes α -amylase d'*Aspergillus oryzae* (TAKA) avec le PAA a été étudiée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (41). Parmi les méthodes expérimentales les plus fiables pour la caractérisation des NPs, il existe l'ultracentrifugation analytique (AUC) et le DLS (42) (Tableau 1). La technique AUC a l'avantage de pouvoir aussi fractionner les particules pendant la sédimentation ce qui la classe comme une des techniques les plus importantes pour la détection et la distribution en taille des nanoparticules, des mélanges des NPs ou des polymères en solution.

1.7 Ultracentrifugation analytique

Theodor Svedberg a développé l'AUC pour des fins médicales dans les années 1920. Cet instrument a été initialement conçu pour la caractérisation de protéines ou de complexes dans des solutions diluées. La technique fonctionne par l'application d'une force centrifuge sur les particules et l'observation de l'évolution de leurs profils de concentration en fonction du temps. Un des avantages de l'AUC est qu'il n'y a pas besoin de marquage ou d'autres modifications chimiques des macromolécules ni d'interaction avec une surface (43). Cette technique a connu malheureusement une baisse d'intérêt pendant de nombreuses années, surtout en raison de l'absence d'appareils capables d'acquérir des données numériques. Avec l'introduction de nouvelles générations d'instruments AUC et le développement de puissants logiciels au cours des années 1990, la capacité de l'AUC pour une analyse plus détaillée des données a été grandement améliorée (44). La technique AUC est maintenant rigoureuse, versatile et adaptée pour l'étude de particules de taille nanométrique à micrométrique (43). Il est possible de déterminer l'association/dissociation des particules/macromolécules, leurs tailles ou leurs distributions de tailles, leurs formes ou leurs densités et ceci sur des systèmes contenant un seul ou de multiples composants(43).

1.7.1 Instrumentation

La technique AUC est utilisée principalement pour l'étude du mouvement des molécules en solution sous l'effet de la force centrifuge (43). Les particules avec différentes densités ou tailles peuvent être séparées selon leur propre vitesse de sédimentation. En effet, la vitesse de sédimentation dépend étroitement des paramètres physicochimiques relatifs à chaque particule ou molécule. Une seule ultracentrifugeuse analytique est disponible commercialement : le ProteoLab™ XL-A / XL-I de Beckman Coulter.

Systèmes de détection. L'ultracentrifugeuse peut être équipée de trois systèmes de détection: a) l'absorbance UV-VIS (190 nm- 800 nm, Beckman Coulter); b) la fluorescence ($\lambda_{\text{ex}}= 488$ nm et $\lambda_{\text{em}} > 505$ nm; Aviv Biomedical) et c) l'interférence (Beckman Coulter). Le système d'absorbance utilise une lampe flash de xénon de haute intensité. La lumière qui passe à travers l'échantillon est enregistrée par un photomultiplicateur (Figure 1.6a) qui a une grande sensibilité pour travailler à de faibles concentrations et une grande sélectivité de détection selon l'absorbance maximale de l'échantillon. L'interféromètre optique de Rayleigh (détecteur d'interférence) offre la possibilité de mesurer le changement d'indice de réfraction résultant des variations de concentration de l'échantillon (Figure 1.6b). Finalement, le détecteur de fluorescence utilise un laser d'argon (Ar^+) et les photons émis (entre 505 nm et 565 nm) sont collectés par un tube photomultiplicateur (Figure 1.6c). Les systèmes de détection sont utilisés pour mesurer les distributions des concentrations générées par le champ gravitationnel, en temps réel et en fonction de la distance du centre du rotor. Le choix du système de détection dépend donc surtout des propriétés physicochimiques de l'échantillon.

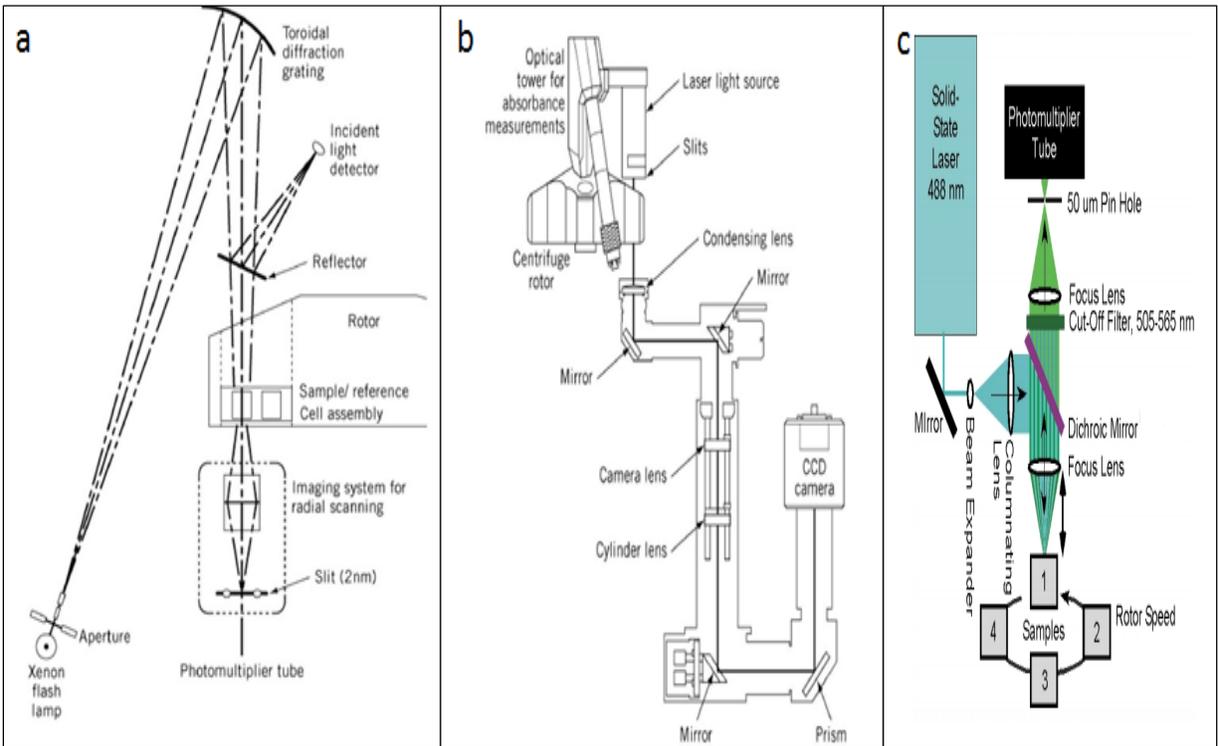


Figure 1.6. Fonctionnement des systèmes de détection. a) Absorbance b) Interférence c) Fluorescence. Tirée de Ralston (45).

Le rotor. Le rotor de titane peut contenir 4 ou 8 cellules. Le rotor à 8 cellules peut subir des vitesses angulaires élevées (jusqu'à 50000 rpm qui correspond à une force centrifuge relative de 181513 x g) permettant l'analyse en parallèle jusqu'à 7 échantillons (interférence/absorbance) ou jusqu'à 14 échantillons (fluorescence). Une cellule est typiquement utilisée comme cellule de référence pour calibrer le rotor.

Les cellules avec des fenêtres en saphir sont quasi transparentes pour la lumière utilisée dans les trois systèmes de détection. Elles sont installées perpendiculairement au plan de rotation. Plusieurs types de cellules existent, mais les plus utilisées ont une pièce centrale faite en résine époxy et de charbon avec deux compartiments: un qui permet de recevoir l'échantillon et l'autre la matrice uniquement de l'échantillon (la référence optique) avec un volume de 100 à 400 μL pour chaque compartiment. La longueur de la cellule est de 12 mm.

1.7.2 Fonctionnement

Le rotor contenant les cellules optiques et installé dans une chambre sous vide tourne à de fortes vitesses contrôlées. Les vitesses angulaires élevées résultent en une sédimentation rapide des composants de l'échantillon avec un minimum de diffusion. Le système de détection optique s'active à de très courts intervalles et seulement lorsque les cellules sont alignées avec le trajet de la lumière optique (Figure 1.7). Cela permet l'enregistrement de profils de concentrations qui résultent des différences de forces dans une direction perpendiculaire à l'axe de rotation. Le déplacement du système de détection ou d'une fente permet l'enregistrement de données sur une certaine longueur de la cellule (soumis à différentes forces g).

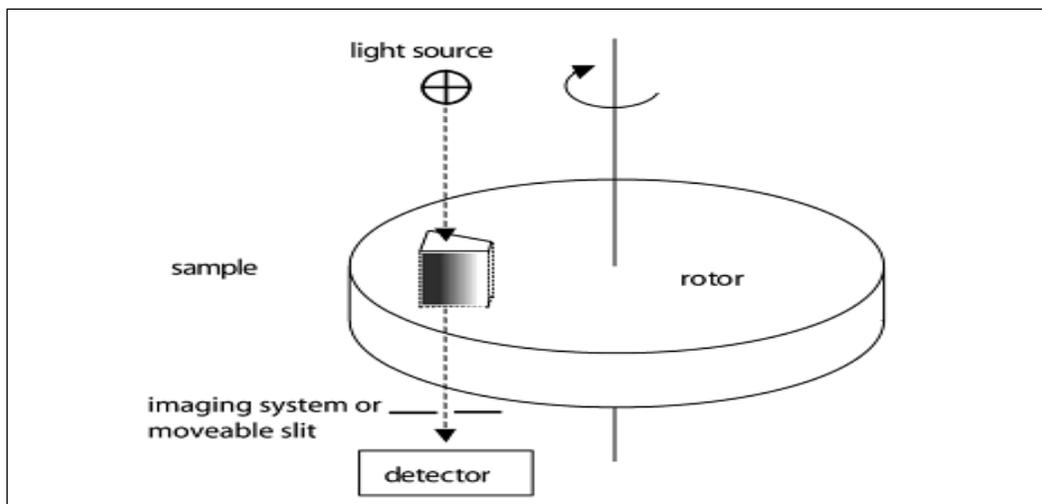


Figure 1.7. Principe de la détection de l'ultracentrifugeuse analytique. Extrait de Scott D. et al. (46)

Il y a deux modes d'analyse principales dans l'AUC: la vitesse de sédimentation (*Sedimentation velocity*, SV) et l'équilibre de sédimentation (*Sedimentation equilibrium*, SE). Dans le premier mode, il est possible de déterminer un certain nombre de paramètres hydrodynamiques tels que les coefficients de sédimentation, de diffusion et de friction ou les informations sur la taille, la masse ou les formes des particules et macromolécules. Dans le second mode, les paramètres thermodynamiques, la conformation moléculaire et les constantes d'équilibre d'association-dissociation peuvent être retirées. Dans ce cas, une information sur

l'homogénéité des échantillons peut également être obtenue (44). Il est donc important de noter que le choix de la méthode d'analyse (SE ou SV) dépend de la nature de l'interaction entre les particules (statique ou dynamique) (47). Les associations statiques sont celles qui sont très lentement réversibles ou irréversibles sur l'échelle de temps de l'expérience. Dans ce cas, il est possible de séparer physiquement les différents états de l'association (en fonction de la masse, la densité et la forme des particules) et de les caractériser individuellement (47), typiquement par la méthode SV (Figure 1.8a). Dans la méthode SV, l'analyse des gradients de concentration en fonction du temps conduit à une estimation du coefficient de sédimentation et de la masse molaire de chaque espèce qui sédimentent. Le transport du matériel vers le fond de la cellule est dû à la force de centrifugation ainsi qu'à la diffusion. Dans le cas des associations dynamiques, elles sont rapidement réversibles sur l'échelle de temps de l'expérience et il est donc impossible de séparer physiquement les différents états de l'association (47). Typiquement, ces associations doivent être étudiées par la méthode SE (Figure 1.8b) où il n'y a pas de transport net (puisque les forces de centrifugation et de diffusion sont égales). Dans ce cas, les distributions sont analysées à l'aide des modèles thermodynamiques.

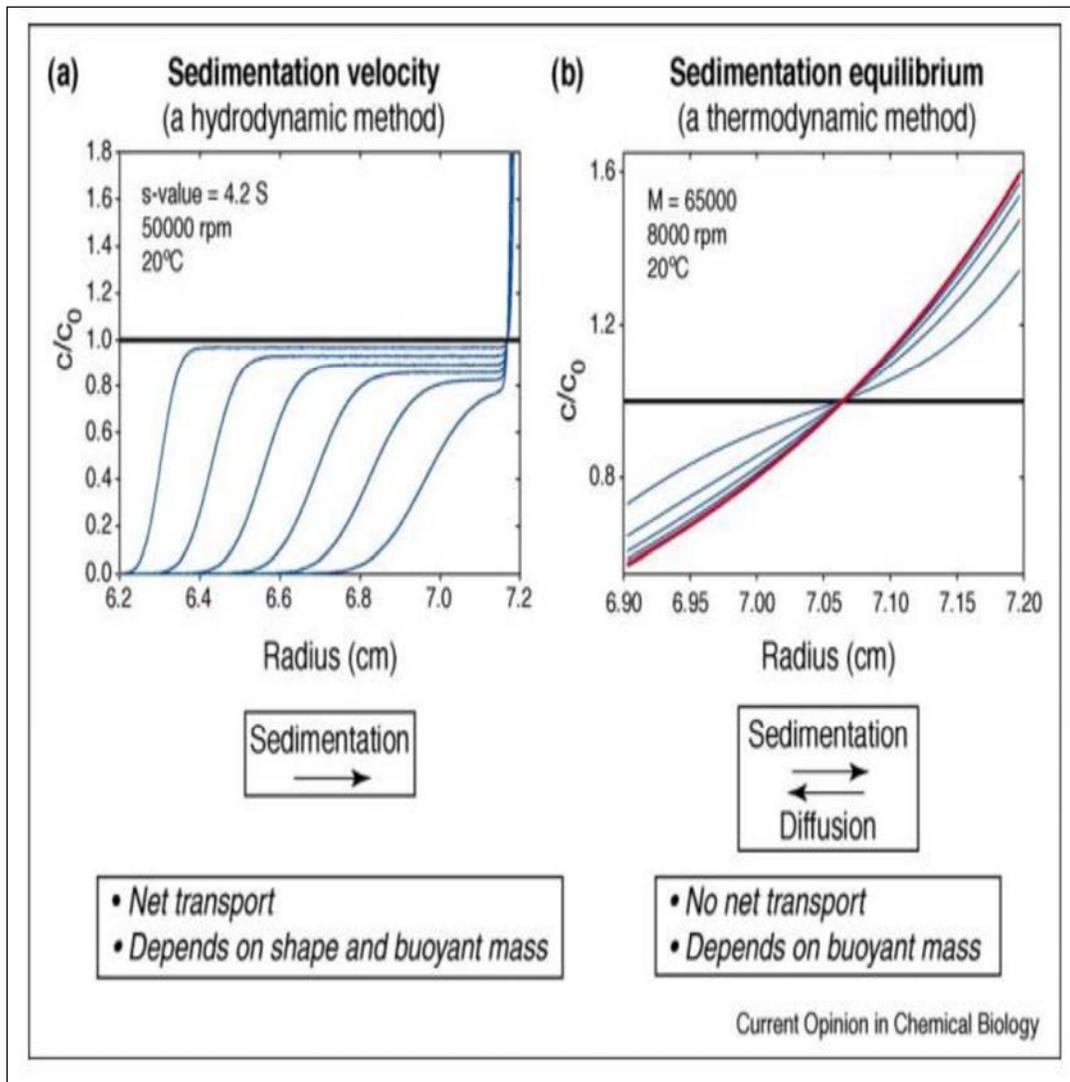


Figure 1.8. Les méthodes d'analyse base de l'AUC: a) la vitesse de sédimentation (SV) avec des intervalles de temps de 5 minutes et b) l'équilibre de sédimentation (SE) avec des intervalles de 4 heures (l'équilibre est atteint entre la sédimentation et la diffusion d'une seule espèce). Tiré de Howlett (2006) (47).

1.7.3 Les principes théoriques

Il existe trois forces qui sont appliquées sur une particule de masse (m_p) en mouvement: la force de flottabilité (F_b), la force de friction (F_f) et la force de sédimentation (F_s). Dans l'ultracentrifugeuse, l'accélération est déterminée par la distance de la particule par rapport à

l'axe de rotation (r) et le carré de la vitesse angulaire (ω) dans l'axe de rotation, en radians par seconde ($\omega = 2\pi \text{ rpm}/60$) (45). Une particule soumise aux trois forces, et à vitesse constante, est illustrée à la Figure 1.9.

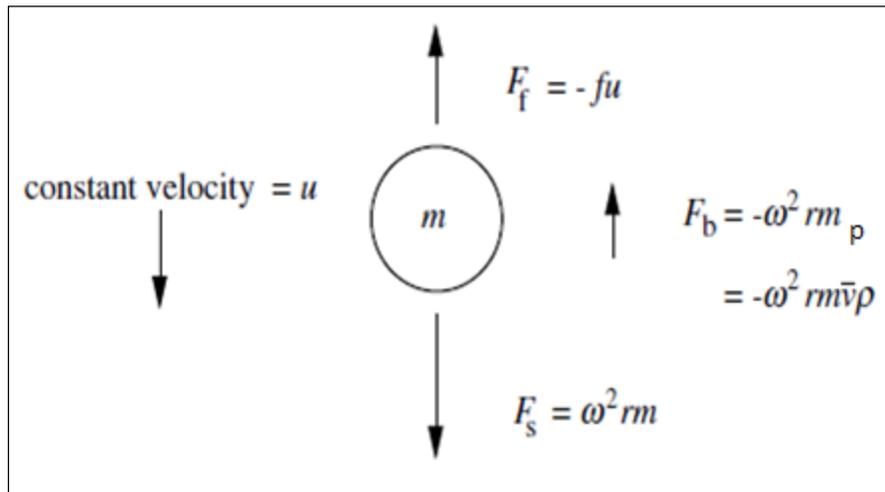


Figure 1.9. Représentation des forces appliquées sur une particule pendant la centrifugation. Tirée de Ralston (45)

Dans la Figure 1.9, les forces F_b et F_f ont des signes négatifs, parce qu'ils fonctionnent dans les sens opposés de la force, F_s . Dans le mode SV, la force de sédimentation doit être beaucoup plus forte que la somme des deux forces opposées pour permettre aux particules de se déposer au fond de la cellule. Cela se produit lorsque les particules sont soumises à un fort champ gravitationnel. Ces forces sont décrites par les équations mathématiques suivantes selon le principe d'Archimède et la loi de Stokes :

- La force agissante sur les particules à base du champ de gravitation:

$$F_s = m_p \cdot \omega^2 \cdot r \quad (2)$$

- La contre-force est exercée sur la particule par la masse du solvant (m_s):

$$F_b = -m_s \cdot \omega^2 \cdot r \quad (3)$$

➤ La dernière force décrit le mouvement de la particule à travers le solvant. La particule se déplace à une vitesse constante (u) en fonction de son coefficient de friction (f):

$$F_f = -u \cdot f \quad (4)$$

Pour des très courts temps (moins que 10^{-6} seconds), les trois forces sont à l'équilibre :

$$F_s + F_b + F_f = 0 \quad (5)$$

La masse du solvant qui interagit avec la particule dépend de sa densité (ρ_s , en g cm^{-3}) et du volume (v) ou du volume spécifique partiel de la particule (\bar{v} , en $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$):

$$m_s = \rho_s \cdot v \quad (6)$$

$$v = \frac{m_p}{\rho_s} = m_p \cdot \bar{v} \quad (7)$$

$$m_s = \rho_s \cdot m_p \cdot \bar{v} \quad (8)$$

En substituant les équations 2, 3, 4 et 8 dans l'équation 5, on retrouve :

$$m_p \cdot \omega^2 \cdot r - \rho_s \cdot m_p \cdot \bar{v} \cdot \omega^2 \cdot r = u \cdot f \quad (9)$$

En remplaçant la masse de la particule par sa masse molaire (M) et le nombre d'Avogadro N_A , on obtient l'équation de Svedberg:

$$\frac{M(1 - \bar{v} \cdot \rho_s)}{N_A \cdot f} = \frac{u}{\omega^2 \cdot r} = S \quad (10)$$

Dans les solutions idéales, le coefficient de sédimentation S (en unité Svedberg (S) = 10^{-13} seconds) d'une particule ou macromolécule et le coefficient de friction dépendent de la taille et de la forme de la particule et du régime dans lequel il se retrouve (laminaire ou turbulent).

Pour une particule sphérique et non poreuse dans le régime laminaire, l'équation de Stokes est décrite par:

$$v_s = \frac{(\rho_p - \rho_s) \cdot g \cdot d_h^2}{18\eta_s} \quad (11)$$

Cette équation incorpore la vitesse de sédimentation (v_s), la viscosité du solvant (η_s), la force de gravité (g), la densité du solvant (ρ_s), la densité de la particule (ρ_p) et le diamètre hydrodynamique de la particule (d_h). En combinant l'équation de Stokes (Équation. 11) et celle qui décrit le coefficient de sédimentation (Équation. 10) à partir de l'égalité de vitesse ($\frac{v_s}{g} = \frac{u}{\omega^2 \cdot r}$), il est possible de trouver le diamètre de la particule:

$$d_h^2 = \frac{18 \cdot \eta_s \cdot v_s}{(\rho_p - \rho_s) \cdot g} = \frac{18 \cdot \eta_s \cdot u}{(\rho_p - \rho_s) \cdot \omega^2 \cdot r} = \frac{18 \cdot \eta_s \cdot S}{(\rho_p - \rho_s)} \quad (12)$$

$$d_h = \sqrt{\frac{18 \cdot \eta_s \cdot S}{(\rho_p - \rho_s)}} \quad (13)$$

L'évolution de la distribution de concentration des particules dans un champ centrifuge peut être décrite par l'équation de Lamm qui tient compte de la diffusion, D , et la sédimentation (48-50). La solution de l'équation de Lamm est basée sur la théorie du transport de masse et est obtenue par la combinaison des dérivées partielles de deux variables dépendantes: le temps (t) et la position radiale (r). En supposant que s et D ne dépendent pas de la concentration des particules, il est possible de dériver l'équation de Lamm :

➤ Processus de diffusion :

$$\frac{D \cdot r \cdot dc(r, t)}{dr} \quad (14)$$

➤ Processus de sédimentation :

$$s \cdot \omega^2 \cdot r^2 \cdot c(r, t) \quad (15)$$

➤ Solution de l'équation de Lamm :

$$\frac{\partial c(r, t)}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left[rD(r) \frac{dc(r, t)}{dr} - s(r) \cdot \omega^2 \cdot r^2 \cdot c(r, t) \right] \quad (16)$$

où $c(r, t)$ est la concentration du soluté en fonction de la position radial et du temps.

Dans le cadre du mémoire, nos études se concentrent uniquement sur la méthode SV car elle est plus rapide, et elle a un plus grand nombre d'applications que la méthode SE.

1.8 Objectifs de l'étude

Dans la dernière décennie, le développement de nanomatériaux avec des nouvelles propriétés chimiques a reçu beaucoup d'attention. Parmi ces produits, des nanoparticules polymériques (Alloperse[®] ou «allosphères») ont été développées pour mieux disperser des pesticides dans les sols agricoles. Cependant, peu d'études sont disponibles pour évaluer l'efficacité ou le comportement de ces NPs dans l'environnement. Ces informations sont importantes pour mieux comprendre leur risque écologique dans les sols ou dans les aquifères qui pourrait être contaminées intentionnellement ou non. Afin de caractériser les nanomatériaux polymériques, une technique peu utilisée pour cette fin a été développée. Il s'agit de l'AUC. Le rôle des facteurs environnementaux importants ont été examinés afin de mieux comprendre la stabilité physicochimique (i.e. agglomération, dissolution) d'une nanoparticule polymérique, très utilisé dans le milieu agricole. Ces informations seront utiles pour prédire les risques environnementaux de ces nanopesticides et de fournir des informations utiles pour modifier ou établir des nouvelles réglementations pour la protection de l'environnement.

Chapitre 2 : Optimisation

L'optimisation des détails expérimentaux des analyses par AUC est examinée dans ce chapitre. Avant l'application de la technique AUC sur les allosphères, il a fallu s'assurer que la méthode SV était fiable et efficace pour l'analyse de très petites NPs. Ainsi, il a fallu surtout prendre en considération la sélection du détecteur, les concentrations détectables des échantillons et le temps et la vitesse de sédimentation.

2.1 Optimisation avec les points quantiques

Les points quantiques (QD) sont intéressants comme NPs modèles, puisqu'il y a un changement notable dans leurs propriétés optiques en fonction de leur taille. En effet, ces NPs présentent une haute photostabilité par rapport aux fluorophores (51). Dans cette étude, les NPs QD-vert (CdTe/CdS; pureté de 97%, de Vive Nano, Inc.) ont été examinées par plusieurs chercheurs dans notre laboratoire en utilisant différentes techniques analytiques (AFM, TEM, FCS). Ces études ont montré que leur diamètre est entre 3 et 4 nm et qu'elles ont une forme presque sphérique. Ces mêmes caractéristiques ont aussi été signalées par le fabricant de ces NPs. Des expériences préliminaires ont été réalisées avec les QD-vert afin de déterminer les limites de détection et la répétabilité de la technique AUC.

2.1.1 Limite de détection avec différents détecteurs

Les concentrations de NPs en environnement sont sûrement très faibles. À titre d'exemple, les concentrations de nAg sont probablement en dessous de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (52). Il est donc important que l'AUC soit capable de mesurer de faibles concentrations de NPs. Ainsi diverses concentrations de QD-vert ont été testées ($[\text{Cd}] = 1,2 \times 10^{-6} \text{ M}$, $1,9 \times 10^{-5} \text{ M}$, $3,8 \times 10^{-5} \text{ M}$, $7,7 \times 10^{-5} \text{ M}$ et $1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$) par AUC-SV (35000 rpm = $98784 \times g$) en employant les systèmes de détection par interférence et par fluorescence. Une solution stock des QD-vert a été diluée dans l'eau Milli-Q ou dans une eau tamponnée à pH 7.0 avec HEPES (10^{-2} M) et les solutions ont été analysées 24 heures après leur préparation. Une densité de 2 g cm^{-3} a été utilisée pour les QD-vert. Les résultats des analyses en fonction de la concentration des QD-vert sont présentés dans le Tableau 2.1 et les Figures 2.1 et 2.2.

Tableau 2.1. Valeurs des diamètres hydrodynamiques des QD-vert mesurées par interférence et fluorescence. ND=non détecté.

QD (concentration)	Fluorescence moyenne (nm)	Fluorescence mode (nm)	Interférence moyenne (nm)	Interférence mode (nm)
$1,2 \times 10^{-6}$ M	ND	ND	ND	ND
$1,9 \times 10^{-5}$ M	ND	ND	ND	ND
$3,8 \times 10^{-5}$ M	$4,8 \pm 0,9$	$4,4 \pm 0,0$	$3,2 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,1$
$7,7 \times 10^{-5}$ M	$4,7 \pm 0,9$	$4,3 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,2$
$1,5 \times 10^{-4}$ M	$4,5 \pm 0,9$	$4,2 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,1$

* l'erreur sur la moyenne de la distribution de taille correspond à la largeur de la distribution (95%), alors que les erreurs sur le mode de la distribution de taille correspondent à l'écart type obtenu à partir de mesures en triplicata.

Les deux plus basses concentrations en QD-vert n'ont pas été détectées par le détecteur de fluorescence ni par le détecteur d'interférence (Tableau 2.1). Pour les autres concentrations, il y a des différences de taille qui dépendent du détecteur utilisé. Nous n'avons pas d'explication sûre pour ces différences observées. Quoique les détecteurs d'interférence et de fluorescence soient basés sur deux principes différents, il est probable que les différences résultent du processus d'analyse de données qui utilisent différents points de repère pour les cellules d'ultracentrifugation. Néanmoins, une différence d'environ 1 nm sur la détermination des diamètres, peut être considérée comme étant très bon par rapport à d'autres techniques analytiques disponibles.

Les diamètres hydrodynamiques étaient très similaires en fonction de la concentration, cependant, la comparaison des Figures 2.1 et 2.2 montre que la distribution de taille change légèrement avec une augmentation de la concentration. Quand la concentration est plus élevée, la distribution de taille semble être plus grande. Néanmoins, pour un même détecteur, les diamètres hydrodynamiques des trois solutions (lignes rouge, bleu et noir) sont très proches. Selon Dam et Schuck (53), la sensibilité et la précision de la distribution $c(s)$ dépendent des valeurs dérivées pour le coefficient de sédimentation et les concentrations de chargement partielles.

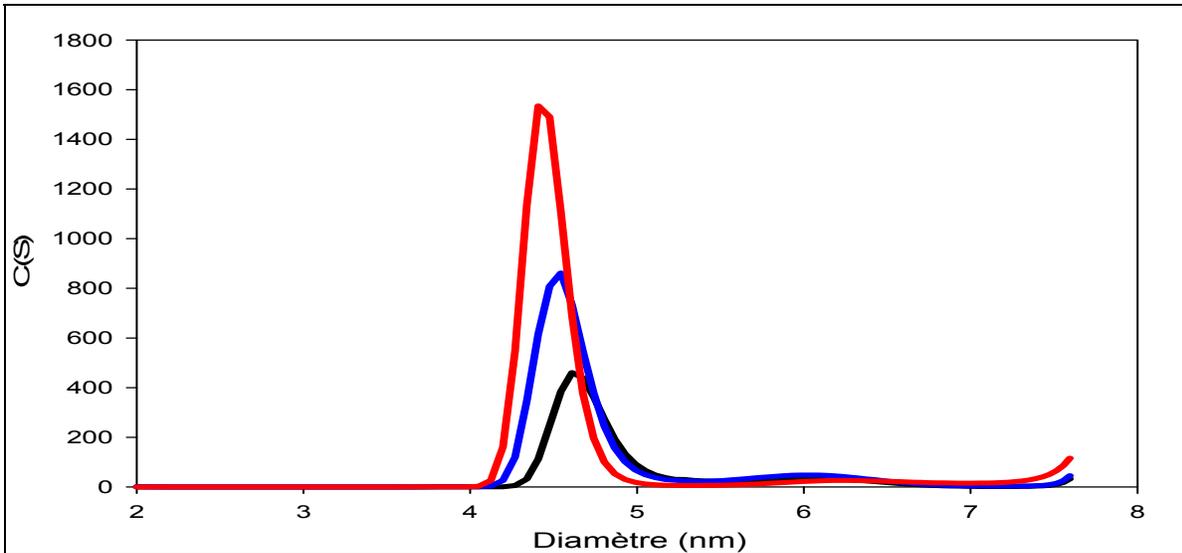


Figure 2.1. Distribution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules QD-vert mesurés par AUC-SV fluorescence. La ligne noire représente une concentration de $3,8 \times 10^{-5}$ M, la ligne bleue une concentration de $7,7 \times 10^{-5}$ M et la ligne rouge une concentration de $1,5 \times 10^{-4}$ M.

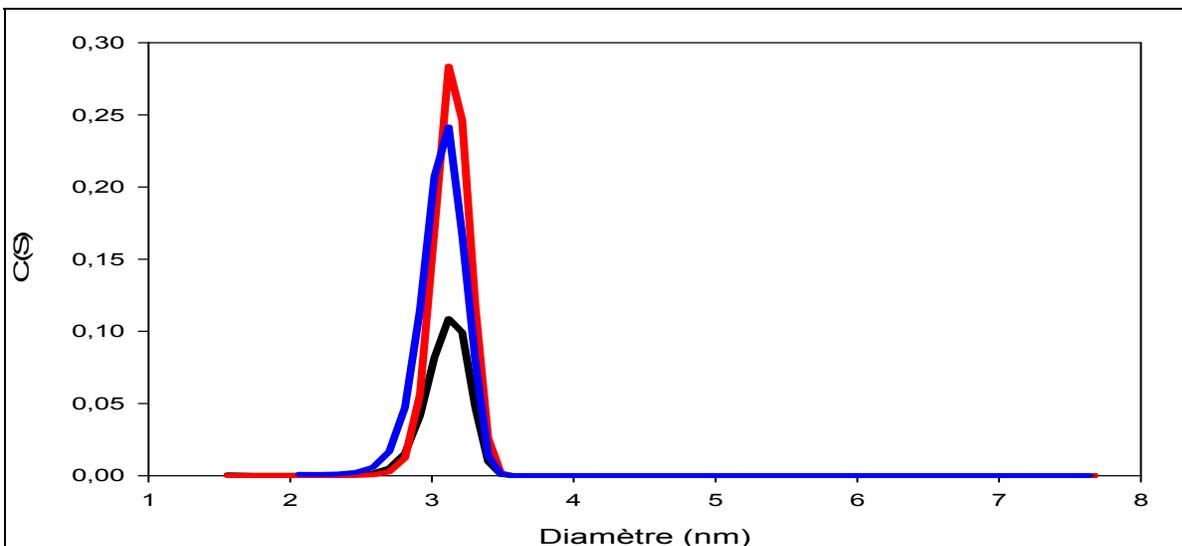


Figure 2.2. Distribution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules QD-vert mesurés par AUC-SV interférence. La ligne noire représente une concentration de $3,8 \times 10^{-5}$ M, la ligne bleue une concentration de $7,7 \times 10^{-5}$ M et la ligne rouge une concentration de $1,5 \times 10^{-4}$ M.

2.1.2 Répétabilité

Une deuxième étude a été réalisée avec les mêmes QD-vert ($7,7 \times 10^{-5}$ M) afin de déterminer la répétabilité des mesures du coefficient de sédimentation obtenu par l'AUC (interférence et fluorescence). Chaque jour pendant 7 jours, les échantillons ont été préparés 24 heures avant leurs analyses. Les solutions stocks ont été diluées dans l'eau Milli-Q ou dans une eau tamponnée à pH 7.0 avec HEPES (10^{-2} M). Chaque échantillon a été centrifugé à 35000 rpm ($98784 \times g$) et analysé avec les systèmes de détections par fluorescence et par interférence. Les résultats de ces analyses sont présentés dans les Tableaux 2.2 et 2.3.

Tableau 2.2. Valeurs des moyennes de la distribution de taille des QD-vert ($7,7 \times 10^{-5}$ M), analysés sur 7 jours par AUC (détecteurs d'interférence et de fluorescence). Les échantillons ont été préparés dans l'eau ou dans une eau à pH 7,0 (tamponnée avec 10^{-2} M).

QD	Fluorescence d_h (nm) H ₂ O	Fluorescence d_h (nm) pH 7,0	Interférence d_h (nm) H ₂ O	Interférence d_h (nm) pH 7,0
Jour 1	$3,9 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,1$
Jour 2	$3,9 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,9$	$1,9 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,6$
Jour 3	$4,3 \pm 1,3$	$4,9 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,9$	$2,8 \pm 0,2$
Jour 4	$3,7 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,1$
Jour 5	$3,7 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,2$
Jour 6	$3,7 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,2$
Jour 7	$3,8 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,1$

* l'erreur sur la moyenne de la distribution de taille correspond à la largeur de la distribution (95%)

Tableau 2.3. Moyennes des distributions de taille des QD-vert ($7,7 \times 10^{-5}$ M) des 7 jours d'analyses. Les échantillons ont été préparés dans l'eau ou dans une eau à pH 7.0 (tamponnée avec 10^{-2} M. HEPES).

QD	Fluorescence diamètre (nm)	Fluorescence mode (nm)	Interférence diamètre (nm)	Interférence mode (nm)
H ₂ O	$3,7 \pm 0,4$	$3,8 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,1$
pH 7.0	$4,7 \pm 0,5$	$4,2 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,3$

* l'erreur sur la moyenne de la distribution de taille correspond à la largeur de la distribution (95%), alors que les erreurs sur le mode de la distribution de taille correspondent à l'écart type obtenu à partir de mesures en triplicata.

L'analyse des résultats des Tableaux 2.2 et 2.3 montre que les d_h pour un détecteur donné (interférence ou fluorescence) sont constants et reproductibles. Cependant, tel que vu dans la section précédente, la moyenne des diamètres obtenus par interférence (entre $2,0 \pm 0,6$ nm et $3,0 \pm 0,4$ nm) était inférieure aux mesures obtenues par fluorescence (entre $3,7 \pm 0,4$ nm et $4,7 \pm 0,5$ nm). Selon l'analyse de ces mêmes QD-vert par AFM (38), un diamètre de 3 à 4 nm était attendu.

La différence de diamètre dépendait aussi fortement du pH. Une comparaison des données pour les échantillons analysés dans l'eau Milli-Q (pH autour de 5.0) a donné des plus petites tailles par rapport à ceux analysés à pH 7.0. Ce résultat a été observé précédemment (38) et a été attribué à une augmentation de la dissolution des QD-vert aux plus bas pH.

2.2 Optimisation de l'AUC pour l'étude des allosphères

Plusieurs paramètres de l'AUC ont été optimisés avant d'entreprendre l'étude sur les allosphères.

2.2.1 Sélection du détecteur et la limite de détection des échantillons

Afin de prévoir la concentration minimum d'allosphères qui pourrait être détectée par l'AUC, plusieurs essais ont été réalisés à des concentrations en dessous de 1 mg L^{-1} ($0,2$, $0,4$, $0,6$ et $0,8 \text{ mg L}^{-1}$) en utilisant des allosphères remplies de Nile-Red et fournies par Vive Crop Protection. De même, trois fluorophores (rhodamine 110, rhodamine 6G et rhodamine 123) ont été ajoutés aux allosphères non-marquées dans nos laboratoires. Dans ce cas, l'objectif était de marquer les allosphères par adsorption passive des fluorophores.

Pour les allosphères remplies de Nile-Red, les concentrations en dessous de 1 mg L^{-1} ne pouvaient pas être analysées par aucun des trois détecteurs. Néanmoins, quelques résultats ont été obtenus pour le système de détection par interférence pour des concentrations de 1 et 5 mg L^{-1} . Pour les deux concentrations, deux pics ont été observés (Figures 2.3 et 2.4), correspondant à deux: entre $6,7 \pm 0,3 \text{ nm}$ et $6,9 \pm 0,5 \text{ nm}$ pour le premier pic 1 et entre $8,9 \pm 0,7 \text{ nm}$ et $9,2 \pm 0,4 \text{ nm}$ pour le deuxième pic, selon la concentration (Tableau 2.4). Puisque ces nanomatériaux provenaient d'une fabrication unique dans le but de faciliter nos analyses, il est probable que la présence des deux tailles était réelle et spécifique à cet échantillon de NPs.

Tableau 2.4. Diamètres hydrodynamiques des nanoparticules d'allosphères remplies avec Nile-Red déterminés par AUC-SV avec un détecteur d'interférence.

Concentration des allosphères-Nile Red	Diamètre hydrodynamique (nm) (Pic 1)	Diamètre hydrodynamique (nm) (Pic 2)
1 mg L^{-1}	$6,7 \pm 0,3$	$8,9 \pm 0,7$
5 mg L^{-1}	$6,9 \pm 0,5$	$9,2 \pm 0,4$

* l'erreur sur la moyenne de la distribution de taille correspond à la largeur de la distribution (95%)

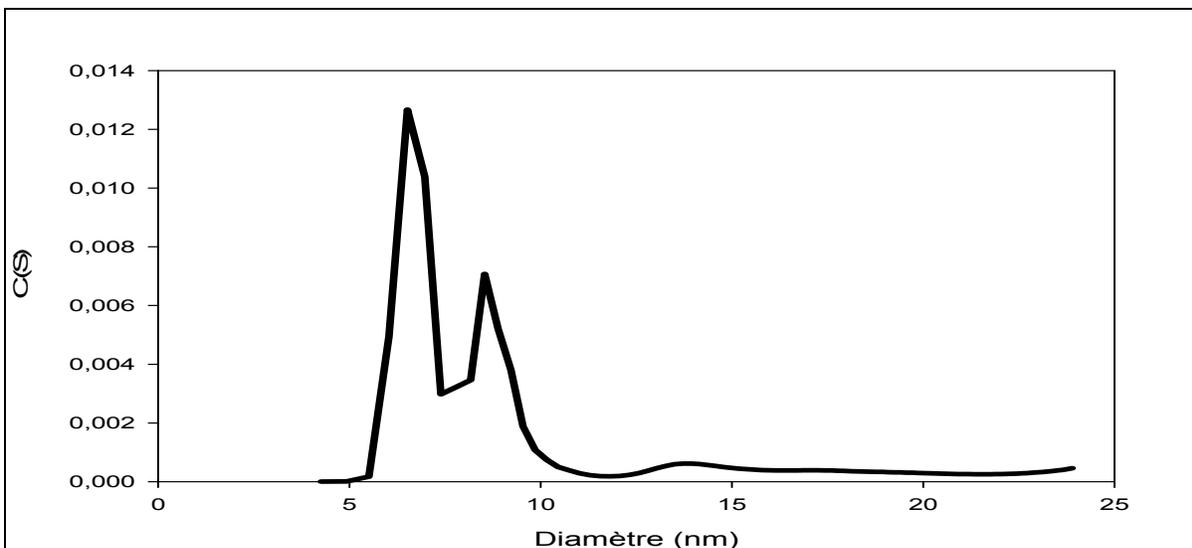


Figure 2.3. Distribution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules allosphères remplies avec Nile-RED (1 mg L⁻¹) mesurée par AUC-SV (détecteur d'interférence). Une vitesse de 40000 rpm (129024 x g) a été employée sur 200 scans et un temps total de 17 heures.

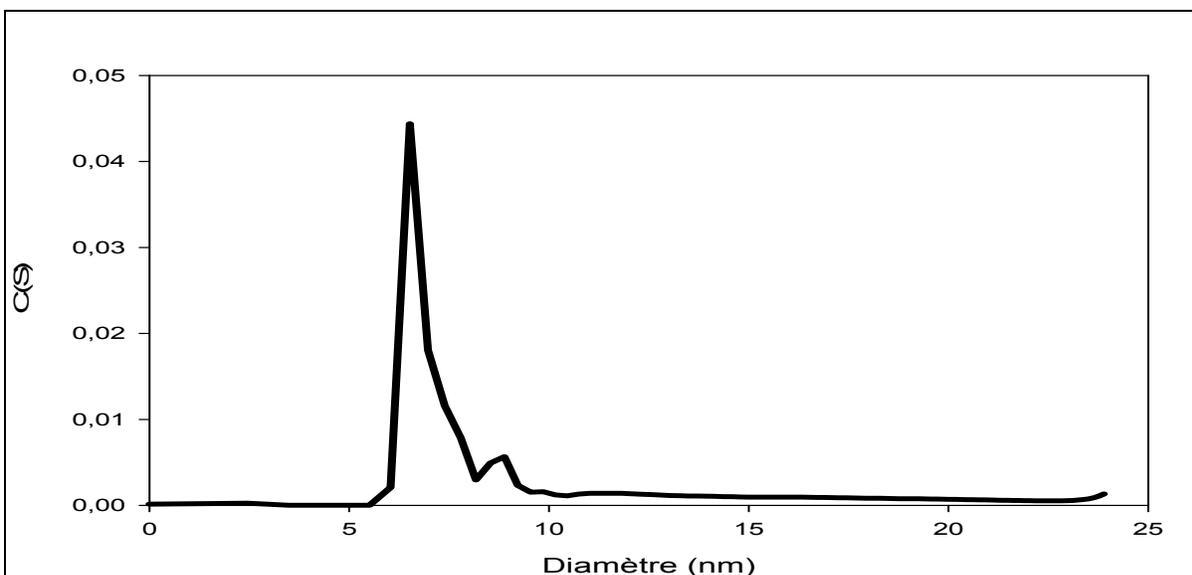


Figure 2.4. Distribution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules allosphères remplies avec Nile-RED (5 mg L⁻¹) mesurée par AUC-SV (détecteur d'interférence). Une vitesse de 40000 rpm (129024 x g) a été employée sur 200 scans et un temps total de 17 heures.

Quoique les expériences aient été réalisées par absorbance et par interférence en même temps, les résultats d'absorbance ont été difficiles à analyser (Figure 2.5). Cela est probablement dû à une quantité importante de fluorophore libre, qui aurait eu moins d'influence sur les mesures d'interférence. Les analyses par fluorescence ont été aussi entreprises et aucun résultat satisfaisant n'a été décelé.

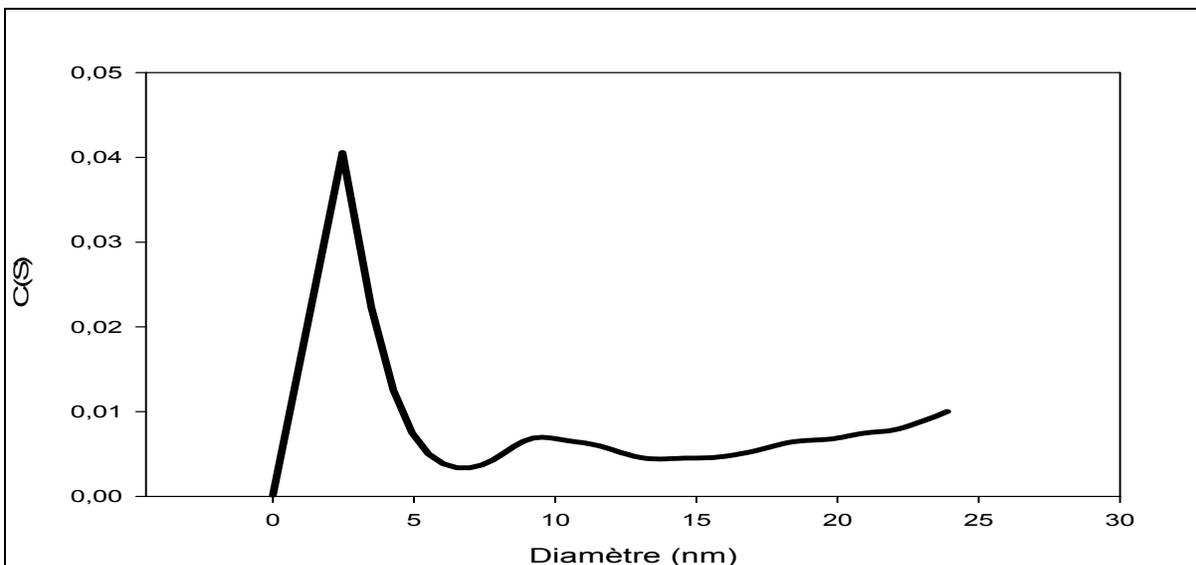


Figure 2.5. Distribution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules allosphères remplies avec Nile-RED (5 mg L⁻¹) mesurée par AUC-SV absorbance.

Pour les allosphères où un dérivé de rhodamine (R110, R6G ou R123) (55) a été ajouté au produit non marqué, deux concentrations de fluorophores ont été testées (10^{-7} M et 10^{-8} M) dans le but de favoriser leur adsorption. Comme précédemment, les échantillons ont été centrifugés à 40000 rpm (129024 xg). Pour les concentrations inférieures à 1 mg L^{-1} , aucun résultat exploitable n'a été obtenu. Par contre, pour 5 mg L^{-1} d'allosphères avec 10^{-7} M de R110 ou de R123, un d_h de $7,6 \pm 1,4 \text{ nm}$ a pu être identifié (Figure 2.6) Néanmoins il a été difficile de savoir quelle proportion de fluorophores a été bien liée aux allosphères. Très probablement, il y avait une quantité importante de fluorophores libres en solution qui nuisait aux analyses du coefficient de sédimentation. La comparaison de deux fluorophores a montré que le marquage

par R123 a donné des pics qui étaient plus intenses par rapport à ceux marqués par la R110. Aucun résultat n'a été obtenu par l'AUC pour la R6G.

Pour les mêmes allosphères, d'autres expériences ont été aussi réalisées avec le détecteur d'interférence. Ces résultats ont démontré que la limite de détection pour ces échantillons était autour de 1 mg L^{-1} , même sans marquage fluorescent (Figure 2.7). Dans ce cas, un d_h de $7,0 \pm 2,0 \text{ nm}$ a été déterminé à une concentration de 1 mg L^{-1} tandis qu'une taille de $7,1 \pm 2,5 \text{ nm}$ a été observée à 5 mg L^{-1} . Ce dernier résultat est très proche de la valeur obtenue précédemment par fluorescence (Figure 2.6), et donc puisqu'il n'est pas nécessaire d'ajouter un fluorophore potentiellement perturbant, le détecteur d'interférence semble être la meilleure option pour la caractérisation des allosphères. Ce résultat est consistant avec celui de Niebel (2013) qui a expliqué que la caractérisation des colloïdes et nanoparticules par ultracentrifugation analytique était rendue plus facile depuis la mise en place de l'interférométrie de Rayleigh (54). Néanmoins, si les NPs sont bien liées au fluorophore approprié, les analyses de fluorescence peuvent aussi donner d'excellents résultats qui permettent de faire des comparaisons entre deux méthodes de détection différentes.

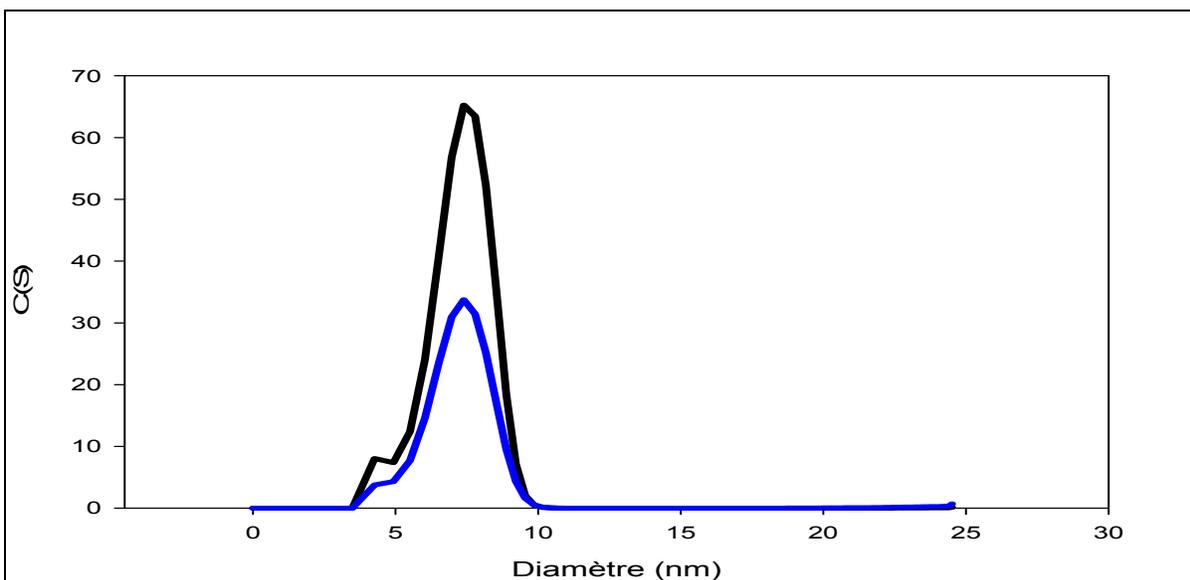


Figure 2.6. Distribution des diamètres hydrodynamiques des allosphères à 5 mg L^{-1} en présence de 10^{-7} M R110 (ligne bleue) ou R123 (ligne noire) mesurée par AUC-SV avec détection par fluorescence.

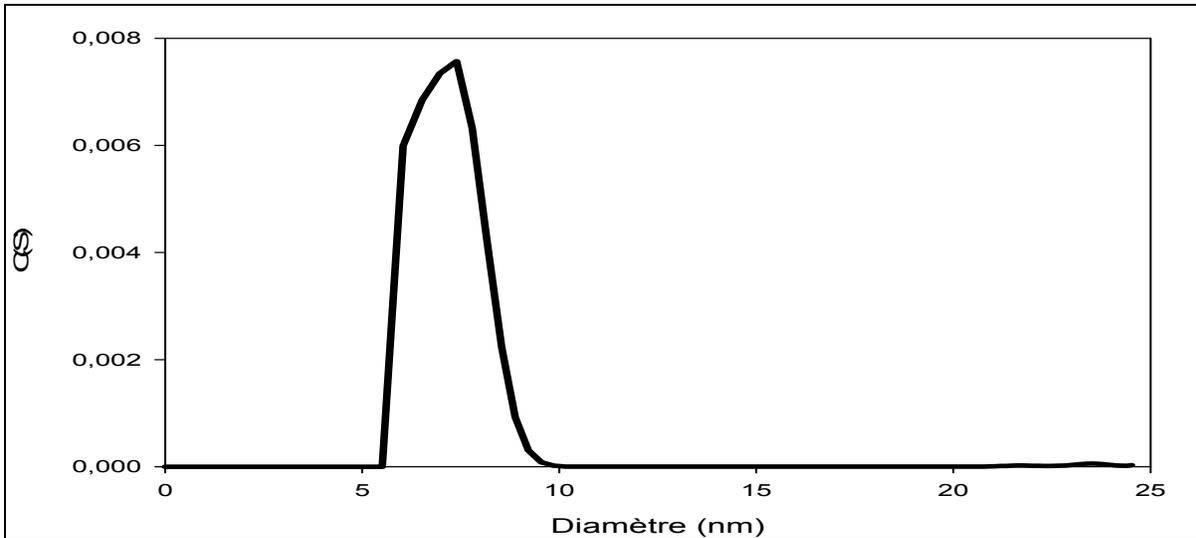


Figure 2.7. Distribution des diamètres hydrodynamiques des allosphères à des 1 mg L⁻¹ mesurée par AUC-SV avec détection par interférence en absence de fluorophore.

2.2 2. Optimisation du temps de sédimentation

Étant donné les différents facteurs (*e.g.* taille des NPs, densité des NPs, forme des NPs, concentrations, densité et viscosité du milieu) qui peuvent avoir une incidence sur le coefficient de sédimentation (44, 53, 56), il est important d'optimiser la vitesse et le temps de sédimentation de l'AUC. Pour les allosphères, le temps de sédimentation a initialement été fixé à 17 heures afin d'identifier tous les composants du système. Par la suite, les temps de sédimentation nécessaires pour mieux identifier les pics ont été évalués selon l'équation (17) :

$$t = \frac{18 \cdot \text{longueur de la zone de détection de la cellule} \cdot \eta_s}{d_h^2 \cdot x \cdot g \cdot (\rho_p - \rho_s)} \quad (17)$$

où la longueur de la zone de détection de la cellule est de 1,5 cm (scan radial entre 5,8 cm et 7,3 cm par rapport à l'axe du rotor) et $x \cdot g$ la vitesse appliquée. Pour une particule avec une densité de 1,09 g cm⁻³ et un d_h de 10,0 nm, on peut estimer un temps de sédimentation de 1.8 heures sera nécessaire à une vitesse de centrifugation de 40000 rpm (129024 x g). Par la suite, les expériences de 2 heures ont été entreprises avec des résultats très semblables à ce qu'on a vu pour 17 heures. Puisque la distribution des coefficients de sédimentation est liée à l'évolution

des profils de concentrations locaux à travers la cellule de centrifugation ($=f(r, t)$) par une équation intégrale (53), il est clair que le temps de sédimentation changera en fonction des caractéristiques de chaque substance à analyser.

2.2 3. Sélection de la vitesse de sédimentation

Afin de s'assurer que la vitesse de sédimentation est la plus appropriée pour la caractérisation des allosphères, deux vitesses (30000 et 40000 rpm) ont été évaluées pour plusieurs concentrations différentes (1 à 5 mg L⁻¹). Comme d'habitude, les solutions ont été équilibrées pendant 24 h avant l'analyse. À la suite de chaque centrifugation, les cellules ont été nettoyées et remplies d'un nouveau volume de solution. La comparaison des coefficients de sédimentation (ou d_H) obtenus montre que les valeurs étaient plus petites à 40000 rpm par rapport à 30000 rpm (Figures 2.8 et 2.9). Malgré le fait que ce résultat est contre intuitif, il correspond aux résultats obtenus par Polson (57) et Charlwood (58) qui ont trouvé que la différence des coefficients de sédimentation pourrait être liée à l'orientation moléculaire ou bien aux effets hydrostatiques sur la solution ou sur la viscosité (57, 58). Par ailleurs, la magnitude de la variation du coefficient de sédimentation (s) avec la vitesse du rotor de l'AUC peut être expliquée par des changements de pression hydrostatique. Dans notre cas, puisque les allosphères ont des propriétés physico-chimiques très différentes de celles des protéines, elles peuvent être particulièrement susceptibles aux changements de pression et potentiellement montrer des grands effets (58).

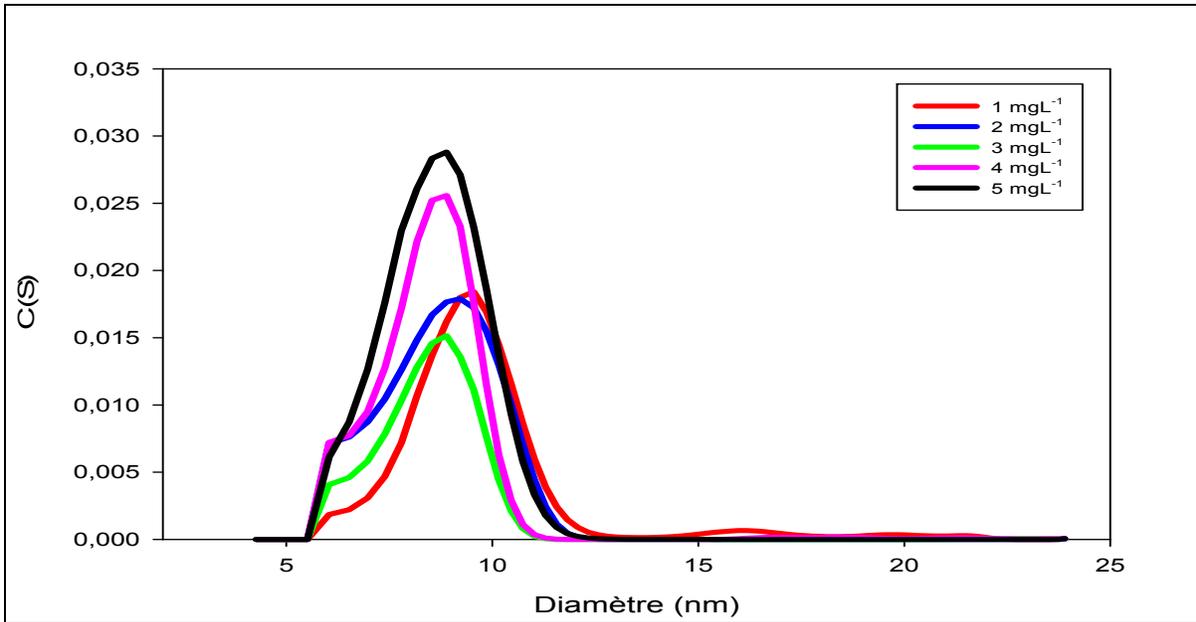


Figure 2.8. Distribution des diamètres hydrodynamiques des allosphères à différentes concentrations (1 mg L^{-1} – 5 mg L^{-1}) mesurée par AUC-SV avec un détecteur d'interférence et une vitesse de sédimentation de 30000 rpm.

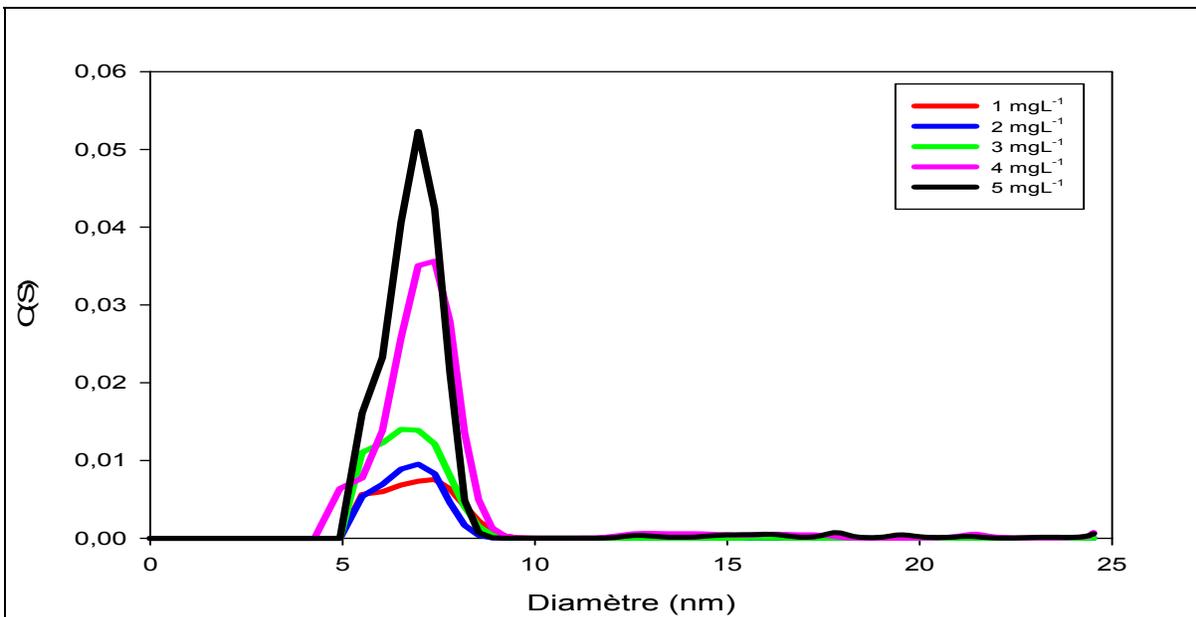


Figure 2.9. Distribution des diamètres hydrodynamiques des allosphères à différentes concentrations (1 mg L^{-1} – 5 mg L^{-1}) mesurée par AUC-SV avec un détecteur d'interférence et une vitesse de sédimentation de 40000 rpm.

2.2.4 Répétabilité des analyses

Afin de vérifier la répétabilité des analyses, des échantillons indépendants ont été préparés et analysés pendant 7 jours consécutifs en utilisant les détecteurs d'interférence et de fluorescence. Tous les échantillons ont été préparés 24 heures avant analyse. Les résultats sont présentés dans les Tableaux 2.5 et 2.6 et les Figures 2.10 et 2.11.

Tableau 2.5. Diamètres hydrodynamiques des allosphères (5 mg L⁻¹) obtenus avec les détecteurs d'interférence et de fluorescence. Une vitesse de 40000 rpm (129024 x g) a été employée pour l'ultracentrifugation.

Allosphères (5 mg L ⁻¹)	Fluorescence diamètre (nm)	Fluorescence mode (nm)	Interférence diamètre (nm)	Interférence mode (nm)
pH 6,0 (jour 1)	7,4 ± 1,3	7,4 ± 0,4	6,8 ± 1,6	6,3 ± 0,1
pH 6,0 (jour 3)	7,2 ± 1,0	7,0 ± 0,1	6,8 ± 1,6	6,3 ± 0,1
pH 6,0 (jour 7)	7,0 ± 1,9	7,0 ± 0,1	7,2 ± 2,0	6,5 ± 0,3

* l'erreur sur la moyenne de la distribution de taille correspond à la largeur de la distribution (95%)

L'analyse des résultats du Tableau 2.5 montre que les allosphères restent stables pendant le premier, le troisième et le septième jour. Les d_h sont très proches entre eux. Par exemple, les tailles obtenues avec le détecteur de fluorescence se situent entre 7,0 nm ± 1,9 et 7,4 nm ± 1,3. Par interférence, les tailles entre 6,8 nm ± 1,6 et 7,2 nm ± 2,0 ont été obtenues. Ces résultats montrent qu'il y a peu de différences entre l'utilisation des différents détecteurs pour la mesure des allosphères. Cependant, pour le détecteur d'interférence (Figure 2.10), il y avait une indication qu'une agglomération a eu lieu contrairement aux résultats de fluorescence (Figure 2.11).

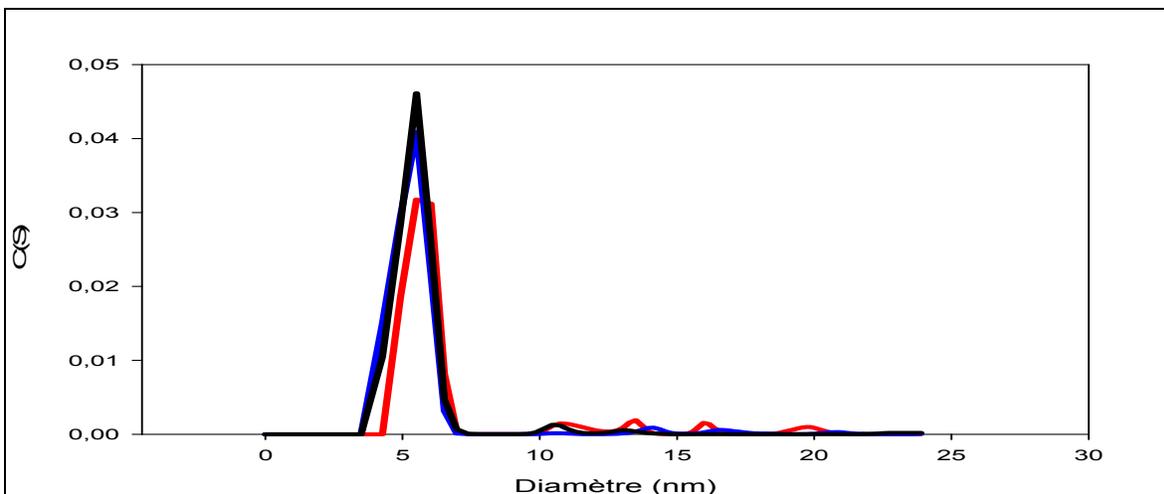


Figure 2.10. Distribution des diamètres hydrodynamiques des allosphères (5 mg L^{-1}) mesurée par AUC-SV avec détection en interférence pendant 7 jours. La ligne noire représente le diamètre des nanoparticules allosphères après 1 jour de la préparation, la ligne bleue représente le diamètre après 3 jours et la ligne rouge représente le diamètre après 7 jours.

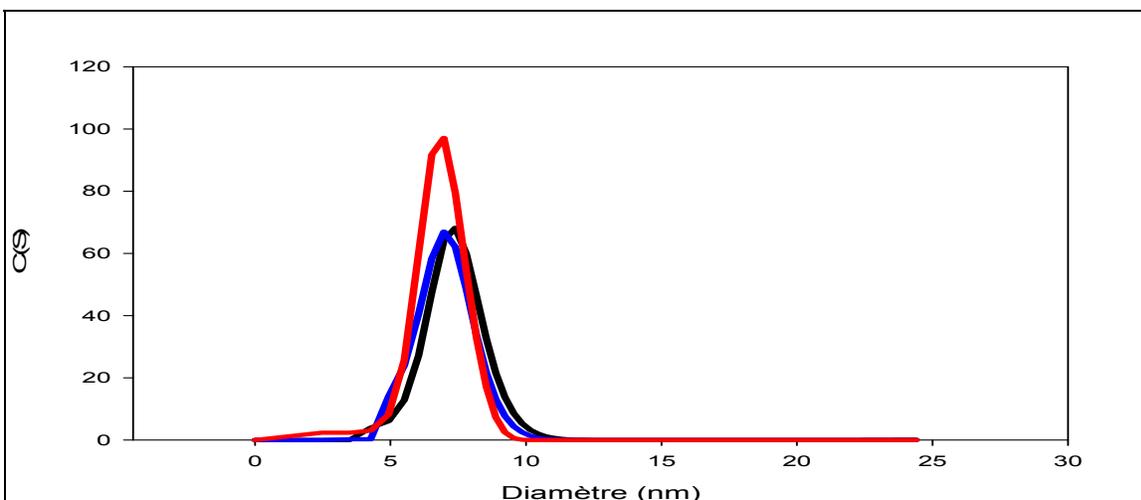


Figure 2.11. Distribution des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules allosphères (5 mg L^{-1}) mesurée par AUC-SV fluorescence pendant 7 jours. La ligne noire représente le diamètre des nanoparticules allosphères après 1 jour de la préparation, la ligne bleue représente le diamètre après 3 jours et la ligne rouge représente le diamètre après 7 jours.

2.3 Conclusion

Les différents résultats montrent que les détecteurs de l'interférence et de la fluorescence sont efficaces pour mesurer les diamètres hydrodynamiques des très petites nanoparticules (<10 nm) par AUC-SV. Ce résultat peut être obtenu en utilisant des vitesses élevées, en fonction des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules employées. Pour la suite des expériences, le détecteur de l'interférence a été utilisé pour la caractérisation des allosphères car il était moins perturbant et avait des limites de détection semblables à celles du détecteur de fluorescence. Ainsi, l'AUC semble être capable de mesurer des concentrations pour des allosphères jusqu'à 1 mg L⁻¹. Selon les résultats obtenus, les meilleures conditions pour suivre les allosphères étaient établies pour une centrifugation de 5 mg L⁻¹ d'allosphères à 40000 rpm (129024 x g) pendant 2 heures.

Chapitre 3 : Article

Présentation de l'article

L'ultracentrifugation analytique est une technique essentiellement utilisée pour caractériser les protéines et leurs interactions. Néanmoins, son utilisation pour la caractérisation des nanomatériaux est de plus en plus fréquente (46). L'objectif de cet article est donc de caractériser des nanoparticules polymériques par l'ultracentrifugeuse analytique et d'évaluer le rôle des facteurs environnementaux (le pH, la force ionique, la concentration de calcium et de matière organique naturelle) sur les distributions de taille des nanoparticules. L'article et son information supplémentaire ont été légèrement modifiés afin d'être compatible avec le mémoire. Par exemple, une seule liste bibliographique peut se retrouver à la fin du mémoire. Cet article et l'information supplémentaire a été accepté par le journal *Environmental Science & Technology* avec la référence suivante :

Characterization of polymeric nanomaterials using analytical ultracentrifugation

Leosveys Diaz, Caroline Peyrot and Kevin J. Wilkinson*

Department of Chemistry, Biophysical Environmental Chemistry group, University of Montreal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montreal (QC), Canada H3C 3J7

*Corresponding author: Phone: +1-514 343 6741; fax: +1-514 343 7586; e-mail:

████████████████████

Abstract

The characterization of nanomaterials represents a complex analytical challenge due to their dynamic nature (small size, high reactivity and instability) and the low concentrations in the environment, often below typical analytical detection limits. Analytical ultracentrifugation (AUC) is especially useful for the characterization of small nanoparticles (1-10 nm), which are often the most problematic for the commonly used techniques such as electron microscopy or dynamic light scattering. In this study, small polymeric nanomaterials (allospheres) that are used commercially to facilitate the distribution of pesticides in agricultural fields were characterized under a number of environmentally relevant conditions. Under most of the studied conditions, the allospheres were shown to have a constant hydrodynamic diameter (d_H) of about 7.0 nm. Only small increases in diameter were observed, either at low pH or very high ionic strength or hardness, demonstrating their high physicochemical stability (and thus high mobility in soils). Furthermore, natural organic matter had little effect on the hydrodynamic diameters of the allospheres. The concentration of the nanoparticles was an important parameter influencing their agglomeration- results obtained using dynamic light scattering at high particle concentrations showed large agglomerate sizes and significant particle losses through sedimentation, clearly indicating the importance of characterizing the nanomaterials under environmentally relevant conditions.

3.1 Introduction

The production of nanomaterials (NM) with different compositions, shapes and reactivities has greatly increased in recent years (2,6,59-60). NM are already used extensively in the formulation of pharmaceutical and personal care products, however novel applications in the agrochemical sector are also beginning to emerge (4). For example, while the use of pesticides generally improves crop yield, their application is often difficult to control, resulting in excess cost, potential phytotoxicity or contamination to soils (61-63). This has led to the fabrication and use of nanopesticides, with numerous formulations including microemulsions, nanoemulsions, nanodispersions and polymer-based nanocapsules (4). Indeed, recent European regulations are requiring a 15-23% reduction of the active ingredient of the pesticides through the development of new formulations or new application methods (4). Nonetheless, it is yet not clear if current regulatory frameworks are sufficient to adequately evaluate the environmental risk of these novel products (64).

Investigations into the environmental fate of NM and evaluations of their risks and benefits represent major challenges (2). Much of the uncertainty is due to a lack of knowledge on the precise quantities of NM that are released into the environment (65, 66) and their physicochemical properties, once in the soils and waters (67). Properties such as the bioavailability and mobility of the NM in the environment will depend directly upon their sizes and physicochemical stability. Unfortunately, neither light scattering nor electron microscopy, which are the most commonly used techniques for characterizing nanoparticles, are appropriate for the weakly scattering, poorly electron dense polymeric nanoparticles. The use of low concentrations and small sizes increases the analytical difficulties even further (62).

Analytical ultracentrifugation (AUC) was originally developed to determine the molar masses, hydrodynamic and thermodynamic properties of macromolecules (and nanoparticles) in solution (68). It is a powerful technique for the characterization of NM, especially in the small size ranges (i.e. 1-10 nm, depending upon particle density). By centrifuging the particles at high centrifugal forces (up to 200000 x g), it is possible to follow their concentration depletion profiles over time in order to determine the particle sedimentation coefficients, S (Equation 1, (44)):

$$S = \frac{u}{\omega^2 \cdot r} = \frac{m(1 - \bar{v} \cdot \rho_s)}{f} \quad (1)$$

where u is the sedimentation velocity of the particle (m s^{-1}), ω is the angular velocity of the centrifuge (rad sec^{-1}), r is the radial distance of the particle from the center of rotation (cm), m is the mass ($m = M/N_A$) of a single particle (g), \bar{v} is the partial specific volume ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$), ρ_s is the density of the solvent (g cm^{-3}) and f is the friction coefficient¹ (which depends on the size, shape and hydration of the particle) (45). For a compact spherical particle under the limit of a low Reynolds number (i.e. small size), the hydrodynamic diameter can be determined from the sedimentation coefficient if the particle density, ρ_p (g cm^{-3}) and the density and viscosity, η_s ($\text{g s}^{-1} \text{cm}^{-1}$), of the supporting liquid are known (45)(48):

$$d_H = \sqrt{\frac{18 \cdot \eta_s \cdot S}{(\rho_p - \rho_s)}} \quad (2)$$

AUC has benefited greatly from recent advances in data analysis techniques (42, 69), such that it is now an excellent technique for determining the sedimentation coefficients of multicomponent systems and their interactions (42, 70). Due to the availability of several detectors (fluorescence, absorbance, interference), AUC has the potential to distinguish nanoparticles from other natural colloids, which gives it the ability to be used in studies of natural systems. Furthermore, it is best suited for the detection of the small (1-10 nm) nanoparticles that are the most difficult to detect but often the most biologically and environmentally relevant (71). The particle friction coefficient can also be determined in order to gain critical information on the particle form.

This project focused on the characterization of polymeric nanocapsules (allospheres) that are commercially used to facilitate the distribution of pesticides to agricultural crops. These nanomaterials are typically applied at concentrations of 25-65 mg L^{-1} (pesticide concentration of 100-200 mg L^{-1} that is associated with the polymer) (72). In this effort, AUC was first optimized for use with the allospheres and then particle size and particle stability were verified

¹ $f = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_H$ (r_H is the hydrodynamic radius)

for a number of environmentally relevant conditions: pH 4-8; ionic strengths of 10- 500 mM; Ca concentrations of 10-500 mM and natural organic matter concentrations of 5-20 mg L⁻¹. Under most of the physicochemical conditions examined, the allospheres were extremely stable, suggesting that their use would lead to significantly increased dispersion of the associated pesticides.

3.2 Materials and Methods

3.2.1 Reagents and solutions

Several nanoparticles were used for the optimization of the analytical ultracentrifuge: nano titanium dioxide (nTiO₂: anatase, 99.7% purity, nominal diameter 5 nm; Nanostructured & Amorphous Material Inc.); nano zinc oxide (nZnO: 99.5% purity, nominal diameter 20 nm; Nanostructured & Amorphous Material Inc.); nanosilver (nAg: 1000 mg Ag L⁻¹ stock solution, nominal diameter of 5 nm; Vive Nano Inc.) and three NIST polystyrene nanoparticle standards (nPS: 24 nm yellow-green labelled (λ_{ex} 505 nm / λ_{em} 515 nm); 52 nm and 54 nm dragon green labelled (λ_{ex} 480 nm / λ_{em} 520 nm); Bangs Laboratories). The oxides (nZnO, nTiO₂) were prepared as 300 mg L⁻¹ stock solutions in Milli-Q water ($R > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, organic carbon $< 2 \mu\text{g L}^{-1}$), which were diluted to 1, 5, 10 and 30 mg L⁻¹ in 10⁻² M HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 99%, Fisher Scientific) at pH 7.0 (38). The nAg stock solution was diluted 200x to give 5 mg Ag L⁻¹ in 10⁻² M HEPES (pH 7.0) (73). nPS stock solutions were simply diluted in Milli-Q water and analyzed at 2, 5 and 1000 mg L⁻¹.

Polymeric nanoparticles (prepared from polyacrylic acid), PB156 Allosperse B7; Vive Crop Protection) were initially prepared at 1000 mg L⁻¹ in Milli-Q water. The stock solution was diluted to test concentrations of 1, 2, 3, 4, 5 mg L⁻¹ in a pH buffer (10⁻³ M HEPES or MES (2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid; 99% purity, Acros) at pH 6.0 (MES), 7.0 (HEPES) or 8.0 (HEPES). High purity sodium hydroxide (NaOH, >98%, Sigma-Aldrich) and hydrochloric acid (HCl, >99%, Fluka, TraceSELECT®Ultra) were used to adjust the pH whereas sodium chloride (NaCl, >99%, Fisher Scientific) and calcium chloride (CaCl₂, >99%, Sigma-Aldrich) were used to adjust the ionic strength. A standard soil humic acid (Elliott Soil, 1S102H) was purchased and prepared initially at a concentration of 500 mg L⁻¹ in Milli-Q water, adjusted to pH 10. The humic acid stock solution was left for 24 h in order to ensure complete hydration prior to dilution

to 5, 10, 15 or 20 mg L⁻¹. All samples were equilibrated for a further 24 h prior to ultracentrifugation. pH was adjusted prior to equilibration and immediately before ultracentrifugation, if necessary.

3.2.2 Analytical ultracentrifugation (sedimentation velocity)

A ProteoLab™ XLI analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter) equipped with absorbance, interference and fluorescence detection (Aviv Biomedical) was employed for ultracentrifugation experiments. The AUC has an eight-hole rotor so that up to 7 experimental conditions can be processed simultaneously (one cell is used as an internal standard). Four hundred μL of each sample were injected into the sample cells, which had sapphire windows and an optical pathlength of 12 mm. Since rotor velocity and detector choice can influence the results of an AUC experiment (74), the technique was first optimized using the standard nanoparticles that could be verified using complementary techniques. Samples were analyzed at least 24 hours after preparation since preliminary experiments showed improved reproducibility when compared with shorter equilibration times (data not shown). A rotor temperature of 20 °C was used in all experiments. All samples were prepared and measured in triplicate. While size distributions for a single runs have been presented below, means and standard deviations reflect the analysis of triplicate measurements.

Sedimentation profiles were loaded into the SEDFIT program (version 14.1) (75) in order to obtain a distribution of the sedimentation coefficients (S), where the integration of the $C(S)$ peaks, corresponded to the height of the sedimentation boundary in the raw data (76). Sedimentation coefficients were calculated using a numerical fitting of the Lamm equation, which includes both sedimentation and diffusion terms but excludes general convection and non-ideal interactions (77). A zone delimited by 1 to 30 S was generally presented below, although larger zones were analysed to ensure that larger particles or agglomerates were not missed. Data were fitted with a second derivative regularization, time-independent noise, a regularization parameter of 0.68 and a resolution of 100. For the allospheres, the frictional ratio² (f/f_0) was fixed at 1.2 and a partial specific volume of 0.92 cm³/g was employed in all calculations. The precise location of the meniscus and the bottom of the solution column were

² f_0 is the friction coefficient of a non-hydrated ideal sphere.

treated as fitting parameters, which were optimized after a manually fitting of the data. Hydrodynamic diameters were determined from sedimentation coefficients using Equation 2. For the quantification of allosphere concentrations, dn/dc values (0.0757 mL g^{-1} in water) were determined using an Optilab T-rEX refractive index detector over the concentration range of $20\text{-}1000 \text{ mg L}^{-1}$ (Wyatt).

A number of preliminary experiments were also performed in order to optimize the ultracentrifugation speed, ultracentrifugation time, number of scans and sample concentration for the size determination of the allospheres (Supplementary information). In summary, centrifugal force was important for determining the size of the smaller nanoparticles and better results were obtained at higher speeds, however, slower speeds were necessary to probe agglomeration. Based upon the optimization, data for the allospheres were acquired at either 5000 rotations per minute ($2016 \times g$) or 40000 rotations per minute ($129024 \times g$) using $400 \mu\text{L}$ of a pH buffered solution at a sample concentration of 5 mg L^{-1} .

3.2.3 Electrophoretic mobility (EPM) and dynamic light scattering (DLS) measurements

DLS and EPM measurements were performed at 20°C on the Wyatt Mobius, which uses a green laser at 532 nm and a 168.7° scattering angle. Given the small sizes and poor scattering capacity of the allospheres, measurements could not be performed at 5 mg L^{-1} , but were instead performed at 200 mg L^{-1} under otherwise identical conditions as were employed for the AUC. The analytical performance of the instrument was systematically verified using a NIST polystyrene standard in ultrapure water with a known diameter of 150.4 nm . Triplicate samples were measured and each sample was divided into nine 1 mL aliquots. A regularization algorithm (7.3.1.15 Dynamic Software) was used to analyze the DLS autocorrelation function. Distributions of the diffusion coefficients were converted to hydrodynamic diameters using the Stokes–Einstein equation.

3.2.4 Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)

FCS is a sensitive technique that can be used to determine the diffusion coefficients of fluorescent or fluorescently labelled molecules and particles. In this study, FCS was used to confirm the hydrodynamic size of a soil humic acid. Measurements were performed on a Leica TCS SP5 laser scanning microscope that used an argon ion laser (488 nm) for fluorescence

excitation and an avalanche photodiode detector for the determination of fluorescence intensity fluctuations. The fluorescence emission of the humic substances was measured in the ranges 503-530 nm as well as 607-683 nm. Diffusion times were determined from an instrument defined autocorrelation function (ISS Vista FCS software, version 3.6 RC Build 3637), following calibration of the size and shape of the confocal volume with rhodamine 6G (55). Hydrodynamic diameters of the humic substances were calculated from the experimentally determined diffusion coefficients using the Stokes–Einstein equation (78). Results were the means of triplicate runs performed on different days using equilibrated (24 h) samples.

3.3 Results and Discussion

3.3.1 Size of the allospheres

Prior to analysing the allospheres, the accuracy of the AUC was tested using several standard nanoparticles of known sizes (nTiO₂, nAg, nZnO, nPS). Excellent agreement was obtained between measured and expected sizes (Tables S1-S3, Figures S1-S6). Hydrodynamic diameters of the allospheres were determined at pH 6.0. When centrifuging at 40000 rpm, a single peak was determined with an average sedimentation coefficient of 2.73 *S*, which corresponded to a hydrodynamic diameter of 7.1 ± 2.5 nm (Figures 3.1A, S7). Under identical conditions, dynamic light scattering (DLS) measurements were not possible due to the weak scattering of the small polymeric nanoparticles. When DLS measurements were performed at a higher concentration of 200 mg L⁻¹, particle diameters of 7.4 ± 0.5 nm (90.5% of the mass, 7.1% of the intensity) and 183 ± 0.6 nm (9.5% of the mass, 92.3% of the intensity) were observed (Figures 3.1B, S8, S9). When AUC experiments were carried out by varying the centrifugal speeds from 5000 to 40000 rpm, both small and large particles (agglomerates) could be observed. Agglomerates were detected by a decrease in the analytical signal of the sedimentation profiles at the lower centrifugal forces (i.e. at 5000 rpm). For example, for 5 mg L⁻¹ of the allospheres at pH 6.0, particle agglomerates (171.7 ± 14.6 nm) were detected at 5000 rpm, albeit with a weak signal intensity corresponding to less than 0.01% of the total particle mass (Figure S10). When the rotational speed was increased to 40000 rpm, a much stronger signal was measured at 7.9 ± 2.9 nm, suggesting that the non-agglomerated allospheres comprised the vast majority (>95%) of the particle mass (Figure S11). The remaining particle mass that was not accounted for by the

large agglomerates or the particle monomers was attributed to polydisperse NP agglomerates in the intermediate particle size fractions (i.e. signal underneath the baseline).

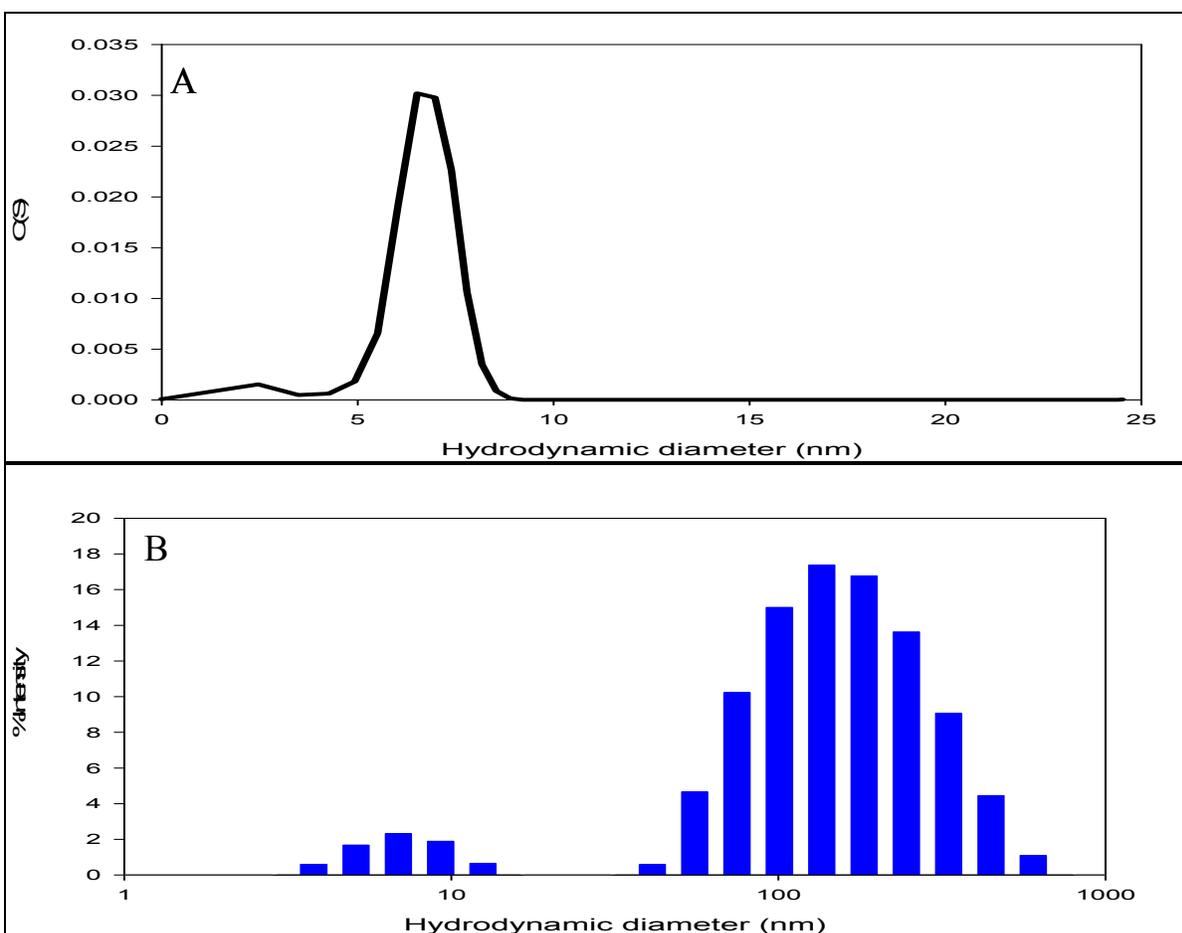


Figure 3.1. (A) Hydrodynamic diameters (nm) determined for 5 mg L⁻¹ of a suspension of allospheres measured using AUC at pH 6.0. At 40000 rpm (129024 x g), a single peak was observed, corresponding to an average hydrodynamic diameter of 7.1 ± 2.5 nm. A very small second peak could also be observed at 172 ± 15 nm when centrifuging at 5000 rpm (2016 x g); (B) Hydrodynamic diameters (nm) determined for 200 mg L⁻¹ of the allospheres, measured by dynamic light scattering at pH 6.0. Two peaks were observed, corresponding to 7.4 ± 0.5 nm (90.5% of the mass, 7.1% of the intensity) and 183±0.6 nm (9.5 % of the mass, 92.3% of the intensity). Raw ultracentrifugation data for Fig. 1A are provided in Fig. S7.

3.3.2 Effect of environmental parameters, including pH, ionic strength and the concentration of calcium and natural organic matter on the particle size distributions

A. Effect of pH. Particle diameters were measured by AUC at 5 mg L⁻¹ and by DLS at 200 mg L⁻¹ for pH values between 4.0 and 8.0 (Table 3.1, Figures S7 and S8). For centrifugation performed at 40000 rpm, there were no statistically significant differences (ANOVA, P = 0.862) among the diameters determined along the pH gradient. Given that the allospheres are an anionic polyelectrolyte (prepared from polyacrylic acid) with a pKa in the range of 4.3 (79-81), they are likely to be highly charged for most environmental pH (i.e. >98% ionization above pH 6). Indeed, electrophoretic mobilities (EPM) of -2.14 ± 0.1 , -2.11 ± 0.2 and -2.11 ± 0.3 $\mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ were measured at pH 6.0, 7.0 and 8.0, respectively (Table 1). These results were consistent with previous studies of the same allospheres at 100 mg L⁻¹ (80), where electrophoretic mobilities of -2.3 ± 0.2 $\mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (pH 8) and -2.1 ± 0.5 $\mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (pH 7) were observed. For pH values above 6, the hydrodynamic diameters of the low intensity peak observed by DLS were similar (ANOVA; P = 0.314), further confirming the presence of a single monodisperse nanoparticle with a symmetrical and well defined peak in the range of 7.1 nm. On the other hand, at pH 4.0 and 5.0, at the high concentrations required by DLS, a white precipitate was observed, which resulted in large standard deviations and variable sizes and EPM values. While no precipitation was observed at 5 mg L⁻¹, some agglomeration (<1%) was detected by ultracentrifugation at the lower centrifugal forces (Figures S10, S11) but the majority of agglomerates were in the intermediate size range (<25%, Table 2). For ultracentrifugation data obtained at 200 mg L⁻¹, increased agglomeration was observed (Figures S12, S13), even at pH 6-8, where the non-agglomerated allospheres represented less than 50% of the particle mass. From these experiments, it was possible to conclude that at 5 mg L⁻¹, the allospheres were very stable over the range of environmentally relevant pH (pH 4-8), with little agglomeration observed. On the other hand, for high concentrations of allospheres, agglomeration, leading to sedimentation occurred for pH values ≤ 5.0 . Clearly, agglomeration depended strongly upon both pH and particle concentration.

Table 3.1. Hydrodynamic diameters (mean and mode) and electrophoretic mobilities of the allospheres as a function of pH. Determinations were performed by SV-AUC (5 mg L⁻¹) and DLS (200 mg L⁻¹). The fractional concentration of the major (i.e. non-agglomerated) allosphere component is determined from an integration of the particle peak.

pH	AUC mean hydrodynamic diameters (nm)*	AUC mode (nm)	Relative weight of primary peak (%)	DLS hydrodynamic diameters (nm)	Electrophoretic mobilities (μm.cm.V ⁻¹ .s ⁻¹)
4.0	8.5 ± 2.0	8.2 ± 0.0	84.0±5.7	precipitation	precipitation
5.0	7.7 ± 2.1	7.7 ± 0.2	77.4±1.9	precipitation	precipitation
6.0	7.1 ± 2.5	6.8 ± 0.3	95.4±2.3	7.4 ± 0.5	-2.14 ± 0.1
7.0	7.5 ± 3.5	6.4 ± 0.3	91.9±2.7	8.2 ± 0.7	-2.11 ± 0.2
8.0	7.5 ± 2.9	6.8 ± 0.2	90.4±1.3	8.3 ± 0.9	-2.11 ± 0.3

*the error on the AUC hydrodynamic diameters corresponds to the width of the particle size distribution (95%), whereas errors on the AUC modes and DLS diameters correspond to the standard deviation obtained from triplicate measurements.

B. Effect of ionic strength. Sedimentation velocity profiles were also used to determine the hydrodynamic diameters of the allospheres as a function of ionic strength (0, 10, 50, 100 and 500 mM NaCl) at pH 6.0. Given the small proportion of large agglomerates detected at 5000 rpm, data are presented for ultracentrifugation at 40000 rpm only. No detectable changes in the diameters were observed for ionic strengths below 100 mM where diameters ranged between 7.0 ± 2.4 nm and 8.2 ± 3.8 nm (Table 3.2, Figure 3.2). On the other hand, increased sedimentation coefficients and an increased polydispersivity were observed at higher ionic strengths where the primary particle size increased from 8.2 ± 3.8 nm (*I*=100 mM) to 12.9 ± 4.8 nm (*I*=500 mM). At 500 mM NaCl, screening of the particle charge by Na⁺ would result in a reduction of the **intermolecular** and the **intramolecular** repulsion among the allospheres. Reduction of the intermolecular repulsion could result in increased particle agglomeration in line with classical double-layer and colloidal stability theories (82, 83). On the other hand, if intramolecular forces are reduced, the collapse of a particle (84) of constant mass would reduce its friction such that it could appear as a larger particle (larger sedimentation coefficient), also consistent with the AUC observations. Nonetheless, given the clear increase in particle

polydispersity (Figure 3.2) and the proportionally decreased signal attributed to the primary peak (Table 3.2), we believe that the former explanation (or a combination of the two explanations) is the most likely. The predominant role of the ionic strength on the reduction of intermolecular rather than intramolecular forces has also been documented previously for humic substances (71), another cross-linked polyelectrolyte (85). It is noteworthy that for the most environmentally relevant ionic strengths in soils (i.e. below 50 mM), particle stability was extremely high.

Table 3.2. Hydrodynamic diameters (means, modes) for the allospheres in the presence of 0, 10, 50, 100 and 500 mM NaCl as determined by analytical ultracentrifugation. Different letters indicate significant differences as identified by an ANOVA and multiple comparisons using the Holm-Sidak test (P=0.05). The fractional concentration of the major (i.e. non-agglomerated) allosphere component is determined from an integration of the particle peak.

NaCl (mM)	Mean hydrodynamic diameters (nm)	Mode (nm)	Relative weight of primary peak
0	7.0 ± 2.4 ^a	6.2 ± 0.3	95.4±2.3
10	6.9 ± 2.5 ^a	6.4 ± 0.3	85.5±7.7
50	7.8 ± 3.4 ^a	6.7 ± 0.2	81.3±3.0
100	8.2 ± 3.8 ^a	7.0 ± 0.0	66.6±2.4
500	12.9 ± 4.8 ^b	12.2 ± 1.0	38.2±3.1

*the error on the AUC hydrodynamic diameters corresponds to the width of the particle size distribution (95%), whereas errors on the AUC modes correspond to the standard deviations obtained from triplicate measurements.

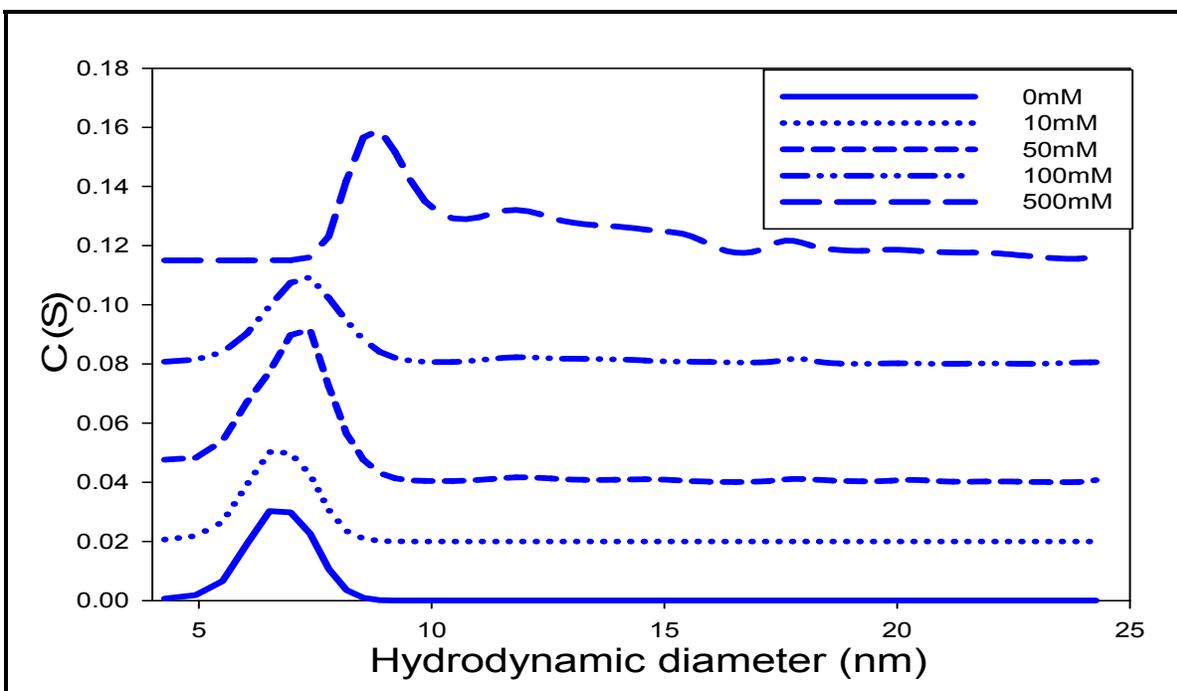


Figure 3.2. Hydrodynamic diameters (nm) of the allospheres at 5 mg L⁻¹ (pH 6.0) at ionic strengths (NaCl) of 0, 10, 50, 100 and 500 mM as measured by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation (SV-AUC).

C. Effect of Ca. In soils, Ca concentrations are typically in the 0.8-20 mM range in temperate regions (86). Since divalent cations are much more effective in masking surface charge as compared to monovalent cations (87), particle diameters were determined for CaCl₂ concentrations that varied between 0 and 500 mM at pH 6.0 (Table 3, Fig. 3). An increase in the hydrodynamic diameters were observed as [Ca] was increased from 0 to 500 mM, although agglomeration was limited to the allospheres at the three highest [Ca] (50, 100, 500 mM). Indeed, the average particle size increased from 7.0 ± 2.4 nm in the absence of added ionic strength to 13.6 ± 4.5 nm in the presence of 500 mM Ca. Particle sizes were very similar to those obtained for the highest sodium concentration (Na: 12.9 ± 4.8 nm and Ca: 13.6 ± 4.5 nm). While particle agglomeration should be affected by both the valence and the concentration of the cations, due to the relatively large polydispersity of the allospheres, particle sizes observed in the presence of sodium could not be distinguished from those determined in the presence of similar concentrations of calcium. Ca binding to the carboxylate functional groups of the

allospheres (leading to bridging flocculation) did not have to be evoked to explain the observations of increasing particle size.

Table 3.3. Hydrodynamic diameters (means, modes) for the allospheres in the presence of 0, 10, 50, 100 and 500 mM CaCl₂ as determined by analytical ultracentrifugation. Different letters indicate significant differences as identified by an ANOVA followed by multiple comparisons using the Holm-Sidak test (P=0.05). The fractional concentration of the major (i.e. non-agglomerated) allosphere component is determined from an integration of the particle peak.

CaCl ₂ (mM)	AUC hydrodynamic diameters (nm)*	Mode (nm)	Size	Relative weight of primary peak
0	7.0 ± 2.4 ^a	6.2 ± 0.3		95.4±2.3
10	8.9 ± 4.1 ^a	7.3 ± 0.2		76.0±4.9
50	10.2 ± 4.9 ^b	7.8 ± 0.4		52.2±1.5
100	12.9 ± 4.8 ^b	12.3 ± 0.6		43.8±6.5
500	13.6 ± 4.5 ^b	12.9 ± 0.7		39.4±5.3

*the error on the AUC hydrodynamic diameters corresponds to the width of the particle size distribution (95%), whereas errors on the AUC modes correspond to standard deviations obtained from triplicate measurements.

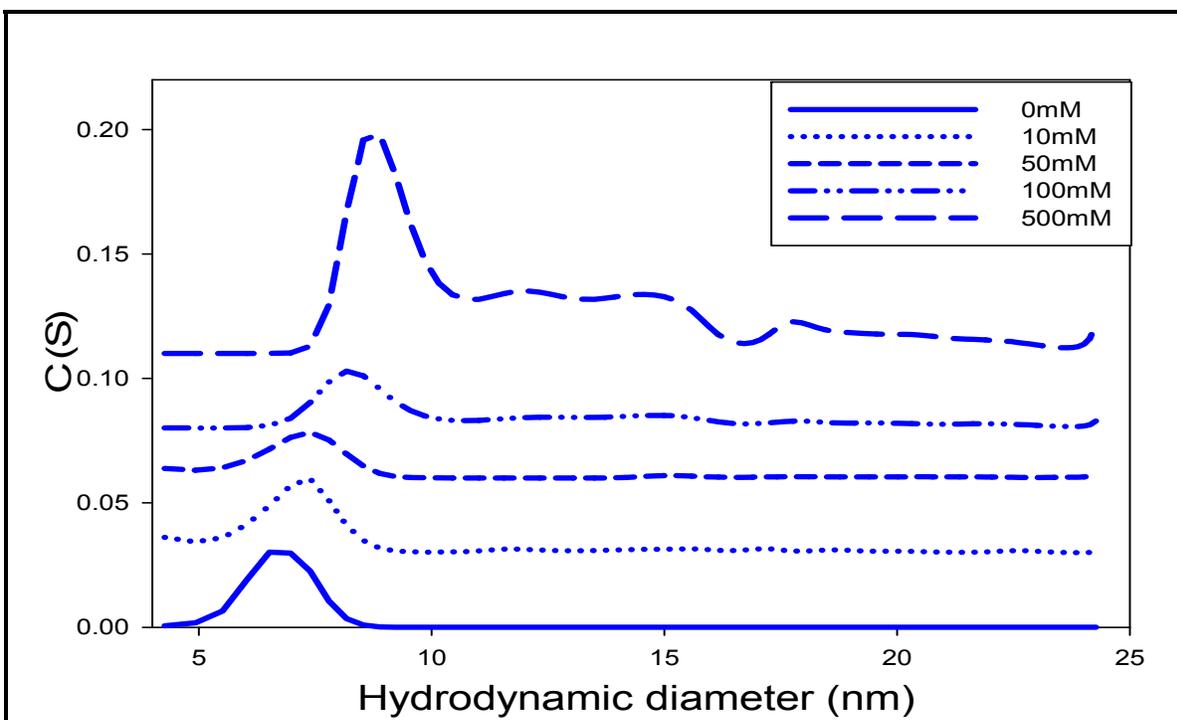


Figure 3.3. Hydrodynamic diameters (nm) of the allospheres (5 mg L^{-1}) at CaCl_2 concentrations of 0, 10, 50, 100 and 500 mM at pH 6.0, as measured by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation.

D. Effect of natural organic matter. In subsurface and groundwater environments, the adsorption of natural organic matter (NOM) is expected to play an important role in the stability of the inorganic colloids (83, 88, 89) either by increasing colloidal stability due to increased (i) electrostatic repulsion or (ii) steric stabilization or alternatively by decreasing colloidal stability (iii) due to bridging flocculation. Note that for mechanisms (ii) and (iii) to be effective, the organic macromolecules (or their agglomerates) must be sufficiently large to extend past the diffuse double layer (which in turn depends on the ionic strength). Indeed, studies on nanoparticles have shown both particle stabilization (88, 90-93) and particle destabilization (89, 94-96) in the presence of NOM (primarily fulvic and humic acids). Since the humic substances are themselves small nanoparticles that are of similar size and charge to the allospheres, they were first characterized under the assumption that they were spherical (i.e. $f/f_0=1.2$), with a density of 1.67 g cm^{-3} (97).

For a soil humic acid at pH 7.5, a sedimentation coefficient of 0.11 S was obtained, corresponding to a hydrodynamic diameter of 2.1 ± 0.2 nm (Figure 3.4) and in line with a value of 2.0 nm obtained previously for a different soil humic acid (97). No agglomeration of the humic acid was observed under these conditions. The size of the humic acid was also evaluated by fluorescence correlation spectroscopy (Supplementary Information), where a diameter of 1.7-2.0 nm was obtained, also consistent with other FCS values determined previously for other humic substances (e.g. Suwannee River fulvic acid: 1.5-2.1 nm; Suwannee River humic acid: 1.7-2.1 nm; pH 4.5-7.5). Molecules in this size range are unlikely to contribute to steric stabilization or bridging flocculation of nanoparticles, except possibly for very high ionic strengths ($I > 50$ mM) or Ca concentrations.

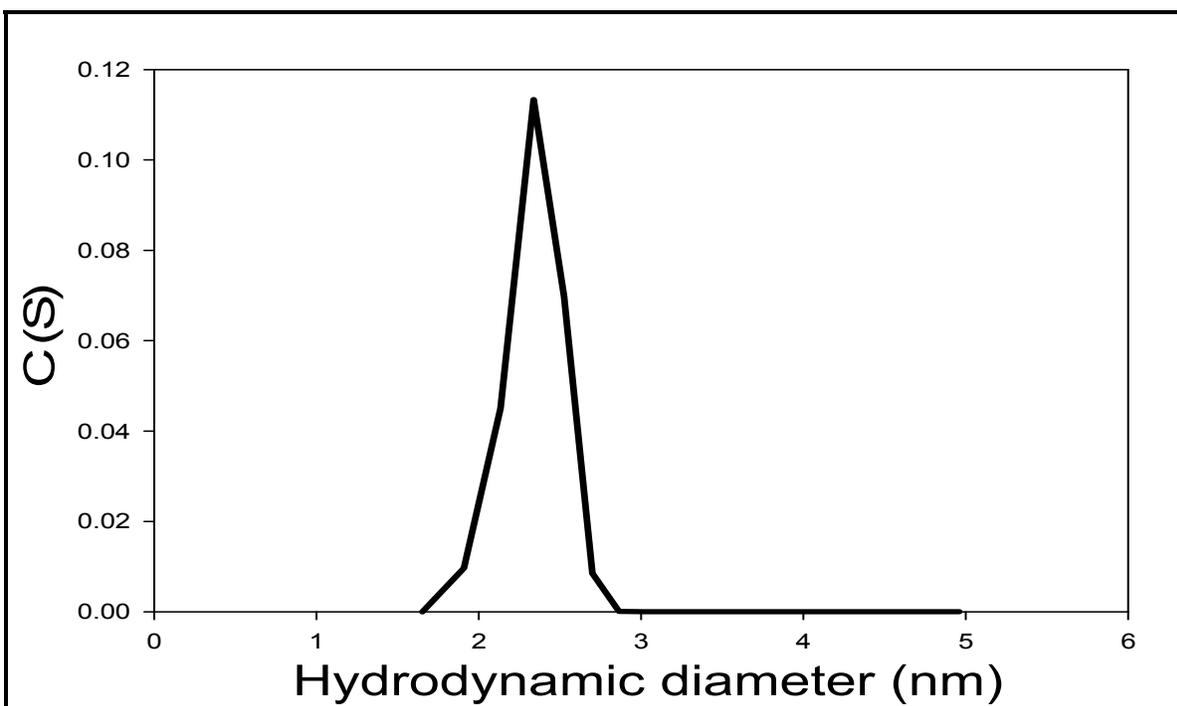


Figure 3.4. Hydrodynamic diameters of 5 mg L^{-1} of the Elliott Soil humic acid (1S102H) based upon analytical ultracentrifugation measurements at pH 7.5 (interference detector, 40000 rpm).

The stability of the allospheres was also evaluated in the presence of both NOM and Ca (Table 4). In the absence of Ca, but in the presence of $5\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$ of the NOM, the allospheres were

monodisperse and of similar sizes to those obtained without NOM (7.0 ± 2.4 nm; c.f. Tables 3 and 4). When Ca was added, the diameters of the allospheres increased as observed previously, irrespective of the concentration of NOM (no significant differences were observed across the NOM concentrations for a given Ca concentration; ANOVA, $P > 0.05$). As above, the results suggested that increasing Ca could cause some agglomeration, but that relatively high concentrations were required (i.e. above 50 mM). The data also showed that NOM did not affect the stability of the colloidal suspension, either by direct adsorption on the nanoparticles or by binding of the NOM. This result was logical given the high negative charge of both the allospheres and the NOM and the presence of a large molar excess of Ca in most of these experiments (0-500 mM Ca, 0.13 mM of COO^- at 20 mg L^{-1} of soil fulvic acid, assuming ca. 13 mM of COO^- per g C; 50% C; (98,99). Although NOM can be adsorbed by negatively charged colloidal surfaces; generally, this results from hydrogen bonding, hydration and hydrophobic effects, which are unlikely to occur here. Indeed, based upon the measured sizes, this system more accurately corresponds to a heterogeneous colloidal system (i.e. heterocoagulation) rather than a classical colloidal system where NOM is adsorbed to a much larger particle surface.

Table 3.4. Hydrodynamic diameters (means, modes) for the allospheres in the presence of CaCl_2 (0, 10, 50, 100 and 500 mM) and NOM (5, 10, 15, 20 mg L^{-1}) as determined by analytical ultracentrifugation (interference detection). The fractional concentration of the major (i.e. non-agglomerated) allosphere component is determined from an integration of the particle peak.

CaCl ₂ (mM)	NOM (mg L ⁻¹)	AUC hydrodynamic diameters (nm)*	Mode Size (nm)	Relative weight of primary peak (%)
0	5	7.1 ± 3.0	6.3 ± 0.5	87.7 ± 2.7
	10	6.3 ± 2.0	6.0 ± 0.5	79.4 ± 4.3
	15	6.1 ± 2.1	5.9 ± 0.6	88.3 ± 2.0
	20	6.2 ± 2.4	5.9 ± 0.3	88.0 ± 5.0
10	5	8.5 ± 4.0	7.1 ± 0.2	68.7 ± 5.5
	10	8.5 ± 4.2	7.0 ± 0.0	66.3 ± 6.8
	15	7.9 ± 4.0	6.5 ± 0.0	62.8 ± 3.4
	20	8.2 ± 4.0	6.6 ± 0.2	73.5 ± 7.7
50	5	11.2 ± 4.8	9.4 ± 1.9	46.4 ± 4.6
	10	11.0 ± 4.8	8.5 ± 0.6	39.8 ± 3.5
	15	11.5 ± 4.7	10.5 ± 1.5	47.1 ± 5.7
	20	11.7 ± 4.9	10.0 ± 1.5	50.5 ± 8.3
100	5	12.0 ± 5.0	9.8 ± 1.4	34.6 ± 2.9
	10	12.3 ± 4.7	10.9 ± 1.2	36.9 ± 7.1
	15	12.6 ± 4.8	12.3 ± 0.8	37.2 ± 6.7
	20	12.8 ± 4.4	12.4 ± 0.9	41.2 ± 4.6
500	5	13.1 ± 5.0	12.1 ± 1.5	31.2 ± 4.8
	10	12.9 ± 4.3	12.1 ± 0.3	25.6 ± 4.3
	15	13.3 ± 4.7	12.7 ± 0.7	30.5 ± 5.9
	20	14.3 ± 4.8	14.2 ± 1.02	32.0 ± 3.7

*the errors on the AUC hydrodynamic diameters correspond to the widths of the particle size distributions (95%), whereas errors on the AUC modes correspond to standard deviations obtained from triplicate measurements.

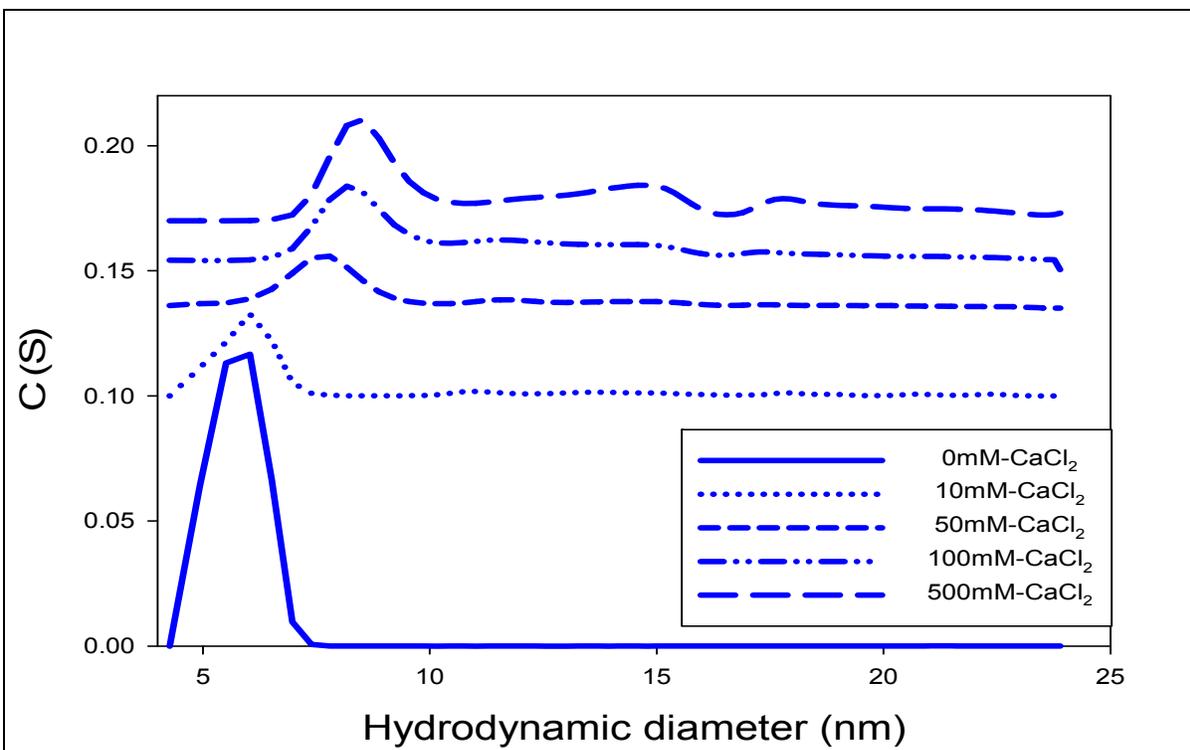


Figure 3.5. Hydrodynamic diameters (nm) of the allospheres (5 mg L^{-1}) in the presence of 0, 10, 50, 100 and 500 mM of CaCl_2 and 20 mg L^{-1} of Elliott-Soil humic acid (1S102H). Sedimentation profiles were measured using the sedimentation velocity analytical ultracentrifuge (interference detector, 40000 rpm).

3.3.3 Allospheres in natural waters. Finally, allospheres were spiked into two natural waters that had been sampled either from the *Des Prairies* river or a wastewater effluent (Montreal, Canada; Section S5, supplementary information). The waters were relatively low ionic strength (below 20 mM) with moderate dissolved organic carbon contents and circumneutral pH.

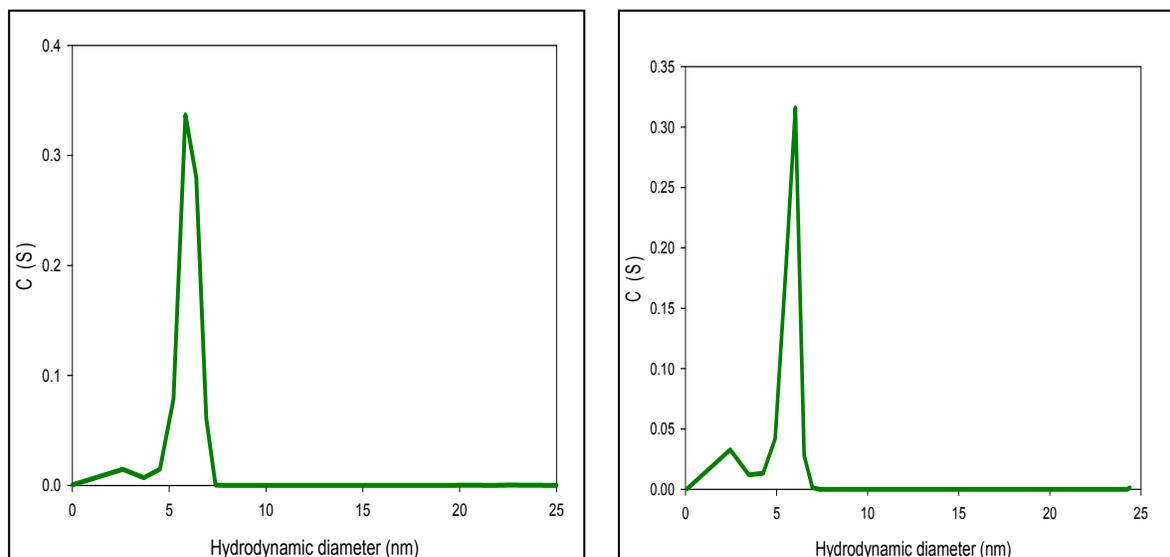


Figure 3.6. Hydrodynamic diameters (nm) measured by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation for 5 mg L⁻¹ of allospheres spiked into two natural waters: (a) Des Prairies River and (b) Effluent from a wastewater treatment plant. Details on each of the samples is given in section S2.5 in the Supplementary Information.

For both natural waters, the vast majority of the (>90%) of the allospheres were found in the non-agglomerated size fraction, in good agreement with the results determined in the reconstituted waters for a similar pH, ionic strength and organic matter concentration.

3.4 Environmental Implications

First of all, this study demonstrated that analytical ultracentrifugation is a powerful tool for the characterization of small, poorly scattering nanoparticles. It is thus a highly complementary technique to both electron microscopy and light scattering for the characterization of nanomaterials. In this study, polymeric allospheres used commonly in the dispersion of pesticides were evaluated under a variety of pH (4.0-8.0), ionic strengths (0-500 mM), Ca (0-500 mM) and NOM (0-20 mg L⁻¹). Under the most environmentally relevant conditions, the allospheres were extremely stable, small and highly charged, which suggests a significantly increased dispersion of associated pesticides. Particle agglomeration was shown to depend on

particle concentrations, demonstrating the need to perform characterization studies under the precise environmental conditions for which one is likely to encounter the NM.

3.5 Acknowledgments

Funding for this work was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC strategic grant) and the *Fonds de Recherche du Québec – Nature et technologies*. We greatly appreciate the technical assistance of Sebastien Maillette. Allospheres examined in this study were graciously donated by Vive Crop Protection.

3.6 Supplementary Material

S1. Sizes of standard nanomaterials

Nanomaterials (NM) with known sizes were analysed by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation (SV-AUC) at 20 °C. Interference detection optics were used to measure nAg, nTiO₂, nZnO, nPS (NIST-52 nm); absorbance detection (wavelength 420 nm) was used for the nAg, and fluorescence detection (excitation: 488 nm; emission: 505 nm) was used for nPS (NIST-24 nm, NIST-54 nm). Centerpieces were filled with 400 μ L of the nanoparticles in buffered solutions (10^{-3} M HEPES at pH 7.0; 10^{-3} M MES at pH 6.0). Rotation speeds (5000-40000 rpm corresponding to relative centrifugal forces, RCF of 2016-129024 \times g), number of scans and the ultracentrifugation duration were systematically tested, depending on the nature of the nanoparticles. NM concentrations were varied between 5 and 1000 mg L⁻¹. All AUC data were analyzed by the SEDFIT program (version 14.1) in order to determine sedimentation coefficients, which were then transformed into hydrodynamic diameters (d_H). The analysis of the sedimentation velocity profiles obtained with interference optics was performed on the basis of non-interacting species.

For 1 g L⁻¹ of the 54 nm nPS, sedimentation profiles were accumulated at 20000 rpm (32256 \times g) for 100 consecutive scans taken at time intervals of 2.40 seconds (Fig. S1A). The most important feature of the sedimentation profiles are the observed sigmoidal shape that migrated with time and as a function of increasing distance from the center of rotation. Using a relative friction coefficient, f/f_0 , of 1.2 (77, 100), which corresponds to a nearly spherical particle, it was possible to identify a single peak corresponding to a sedimentation coefficient of 72.7 S or a diameter of 50.3 ± 7.9 nm (Fig. S1B). The sedimentation coefficient was determined from the position of the peak maxima, whereas the uncertainty was calculated from replicate measurements obtained on different days. Sizes were obtained in a similar manner for the nTiO₂, nAg, nZnO and other nPS (Table S1, Fig. S2, S3, S4). In most cases, a single peak was identified with a hydrodynamic diameter that was very close to the manufacturer's value.

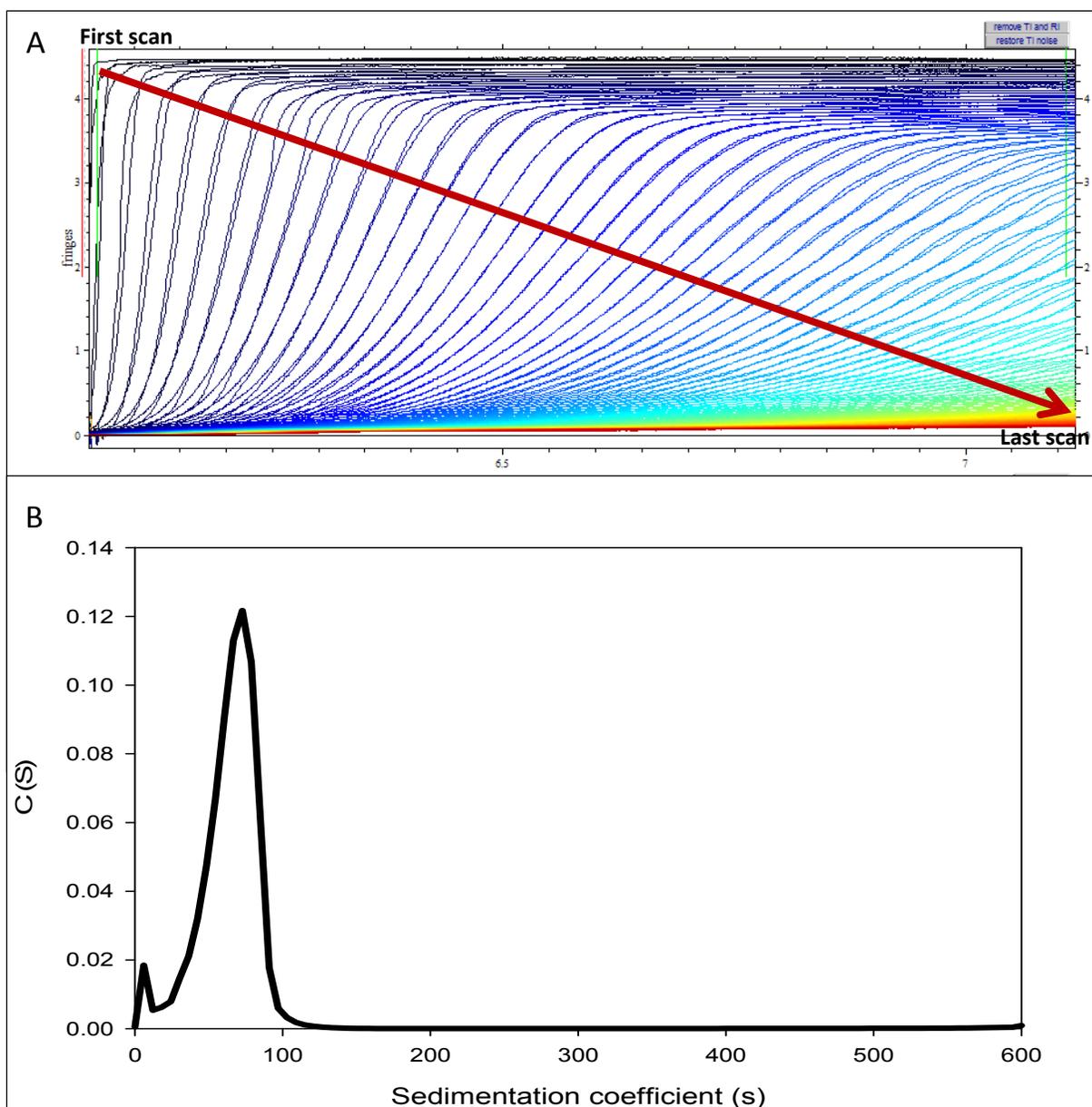


Figure S1A. Raw sedimentation profiles (100 scans) for 1 g L^{-1} of a nPS standard (54 nm) in water when measured using interference optics following centrifugation at 20000 rpm. The x-axis label corresponds to the distance from the center of rotation of the ultracentrifuge. S1B. Sedimentation coefficient distribution (peak maximum at 72.7 S) obtained from the analysis of Figure S1A. All data were acquired using the OPTIMA XL-I (Beckman Coulter). For a particle density of $\rho=1.09 \text{ g cm}^{-3}$ relative to water ($\rho_0=0.997 \text{ g cm}^{-3}$), the sedimentation coefficient corresponded to a particle size of $50.3 \pm 7.9 \text{ nm}$ at the maximum peak intensity.

Table S1. Nominal and measured particle diameters determined for several aqueous suspensions of nanoparticles (nTiO₂, nAg, nZnO, nPS). Ultracentrifugation velocity was varied between 10000 (8064 x g) and 40000 rpm (129024 x g), depending on the characteristics (expected diameter, density) of each nanoparticle.

Nanoparticle	Nominal diameter (nm)	Measured diameter (nm)	Ultracentrifugation velocity (rpm)	Particle density (kg m ⁻³)
nTiO ₂	5	3.9 ± 1.4	30000	3900
nAg	1-10	3.6 ± 1.6	10000	3490*
nZnO	20	22.7 ± 2.3	10000	5600
nPS	24	29.6 ± 7.5	30000	1050
nPS	52	49.0 ± 7.2	20000	1050
nPS	54	50.3 ± 7.9	20000	1050

* for the nAg, particle density was determined by taking into account the polymer coating (67% of the particle mass).

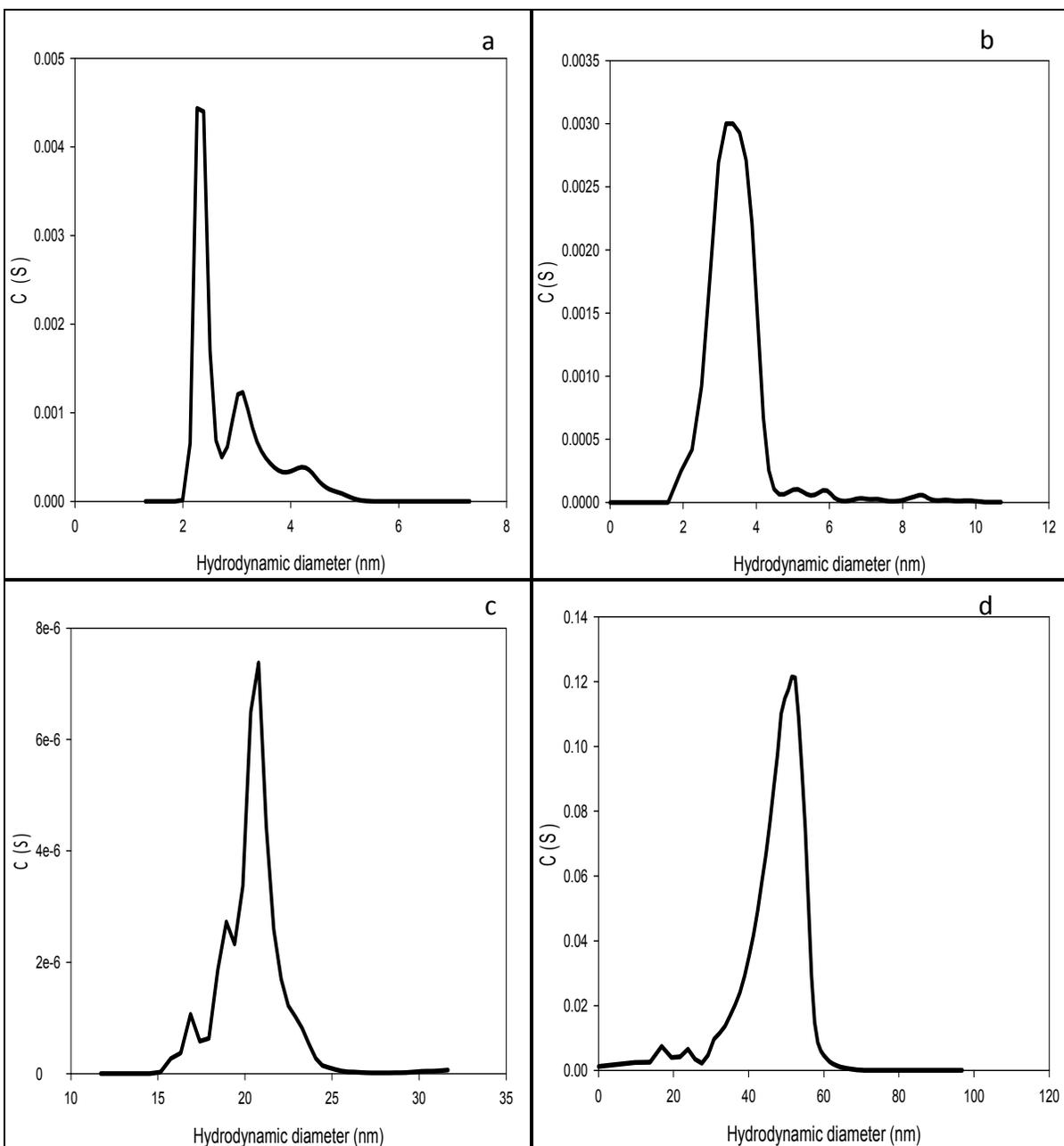


Figure S2 (a,b,c,d). Hydrodynamic diameters of nanoparticles determined by SV-AUC using an interference detector (a) nAg (Vive Nano, nominal diameter of 1-10 nm); (b) nTiO₂ (Nanostructured & Amorphous Material Inc., nominal diameter of 5 nm); (c) nZnO (Nanostructured & Amorphous Material Inc., nominal diameter of 20 nm); (d) nPS (Bangs Laboratories, nominal diameter of 52 nm). Measured sizes are compiled in Table S1.

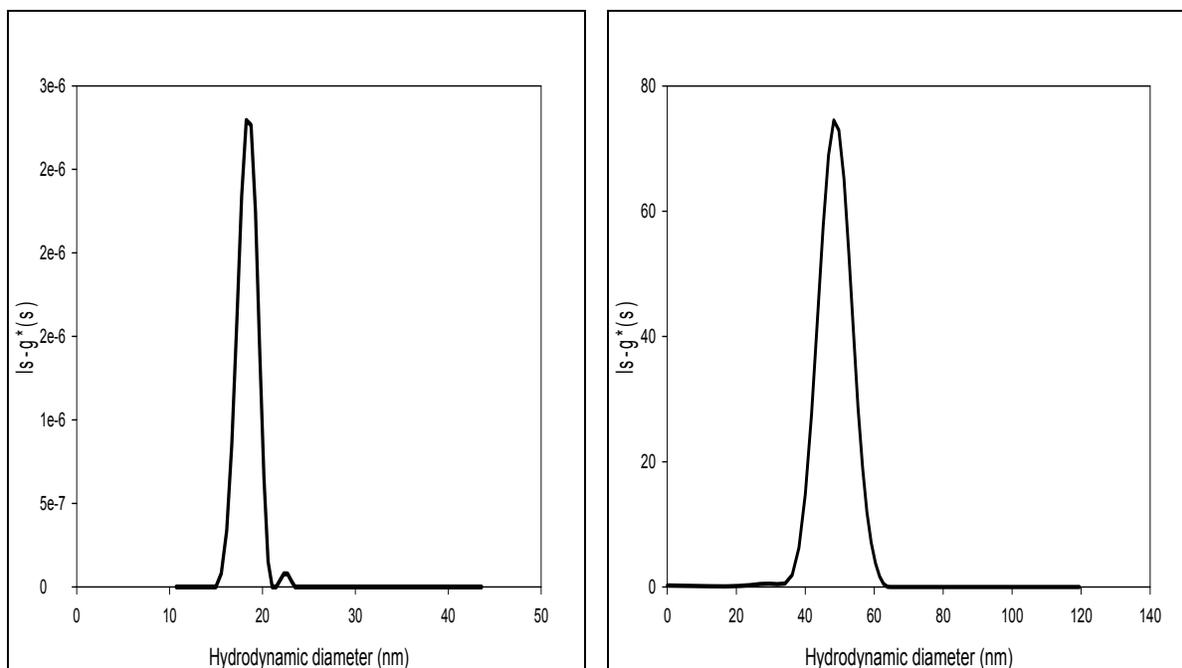


Figure S2 (e, f). Hydrodynamic diameters of nanoparticles determined by SV-AUC using an interference detector for the 2 largest particles in Fig. S2 (e) nZnO (Nanostructured & Amorphous Material Inc., nominal diameter of 20 nm) and (f) nPS (Bangs Laboratories, nominal diameter of 52 nm). Data were determined using a different model ($g(s)$) as compared to Fig. S2 (c(s)).

For the nAg, the absorbance detector (420 nm) was also employed (Figure S3) for comparison with the results obtained by interference (Figure S2a). The observed d_H of 3.9 ± 1.2 nm for the nAg corresponded well to that obtained by interference (3.6 ± 1.6 nm) and with previously published literature values (fluorescence correlation spectroscopy: 2.0 ± 0.4 nm; transmission electron microscopy: 2.0 -10.0 nm (101). Similarly, the labelled nPS could be also be measured using fluorescence detection (Table S2; Figure S4).

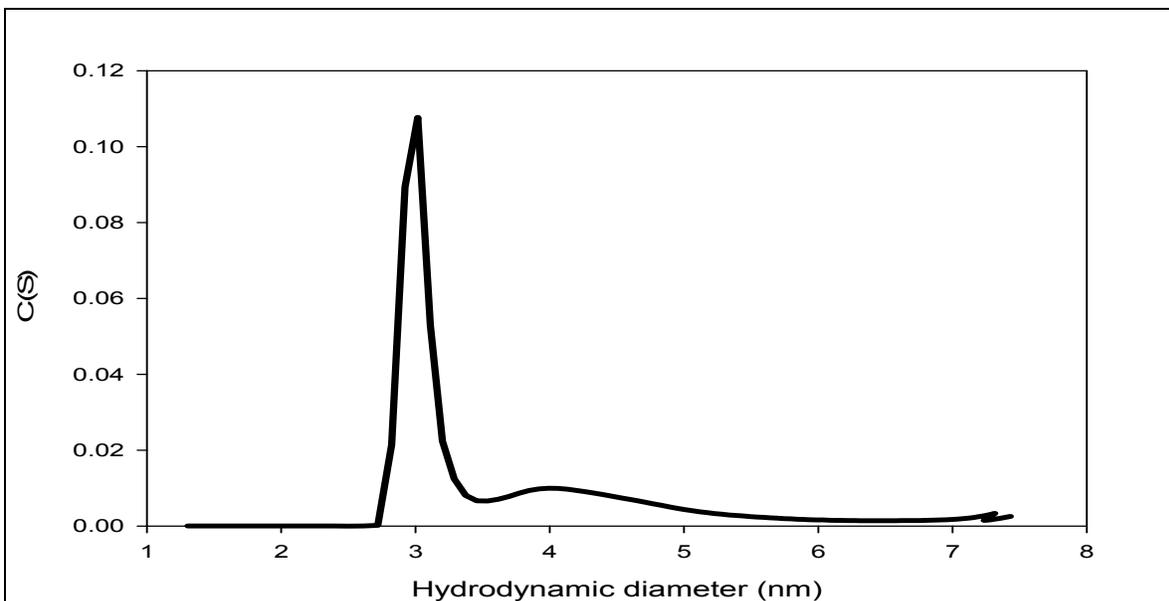


Figure S3. Hydrodynamic diameter of the nAg as determined by SV-AUC using an absorbance detector.

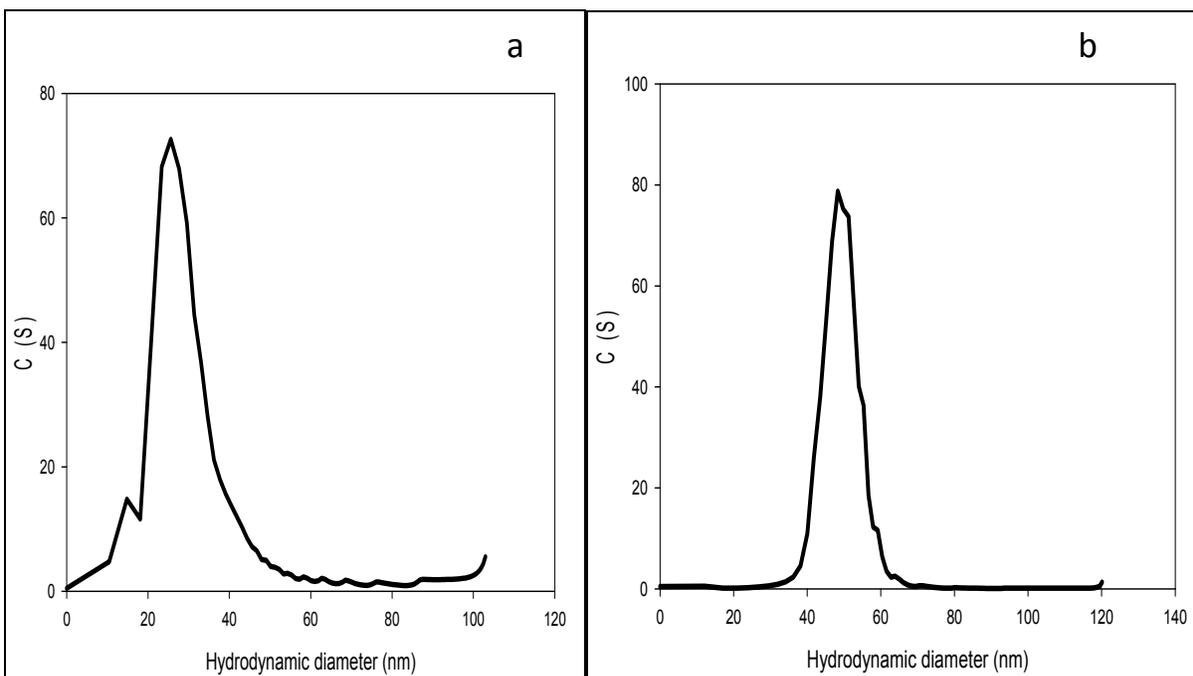


Figure S4. Hydrodynamic diameters of two fluorescent nPS as measured by SV-AUC using fluorescence detection: (a) nPS ((Bangs Laboratories, manufacturer's diameter 24 nm); (b) nPS

((Bangs Laboratories, manufacturer’s diameter 52 nm). Measured sizes are compiled in Table S2.

Table S2. Hydrodynamic diameters of two fluorescent NM obtained by SV-AUC using a fluorescence detector.

NM	Concentration (mg L ⁻¹)	Nominal diameter (nm)	AUC hydrodynamic diameter (nm)	Ultracentrifugation velocity (rpm)
nPS	1000	24	29.6 ± 7.5	30000
nPS	1000	52	49.0 ± 7.2	20000

A number of preliminary experiments were also performed in order to optimize the ultracentrifugation speed, ultracentrifugation time and number of scans for the size determination of the allospheres. In summary, centrifugal force was important for determining the size of the smaller nanoparticles and better results were obtained at higher speeds, however, slower speeds were necessary to probe agglomeration.

S2. Limits to the sensitivity of the AUC detectors

Based upon the optimization, all subsequent data for the allospheres were acquired at either 5000 rotations per minute (2016 x *g*) or 40000 rotations per minute (129024 x *g*) using 400 μL of a pH buffered solution at a sample concentration of 5 mg L⁻¹.

The ability of the AUC to detect low concentrations of the allospheres was evaluated. Since the goal was to examine the most environmentally relevant concentrations of the nanomaterials and based upon preliminary results, the sensitivity study was focused on concentrations ranging between 1 and 5 mg L⁻¹. Particle size distributions could be detected for all 5 concentrations. Some variation was observed among the different concentrations; however, the variability was on a similar order of magnitude as the variation that was observed among replicate samples (± 1.0 nm). Although the allospheres could be detected at all concentrations, the distributions were more reproducible and easier to model for the two highest concentrations (Table S3, Figure S5).

Table S3. Hydrodynamic diameters of different concentrations (1-5 mg L⁻¹) of the polymeric nanoparticles (allospheres) using SV-AUC with interference detection at 40000 rpm.

Concentration (mg L ⁻¹)	AUC hydrodynamic diameter (nm)
1	7.0 ± 1.7
2	6.9 ± 1.6
3	7.0 ± 2.5
4	7.1 ± 2.3
5	7.0 ± 2.6

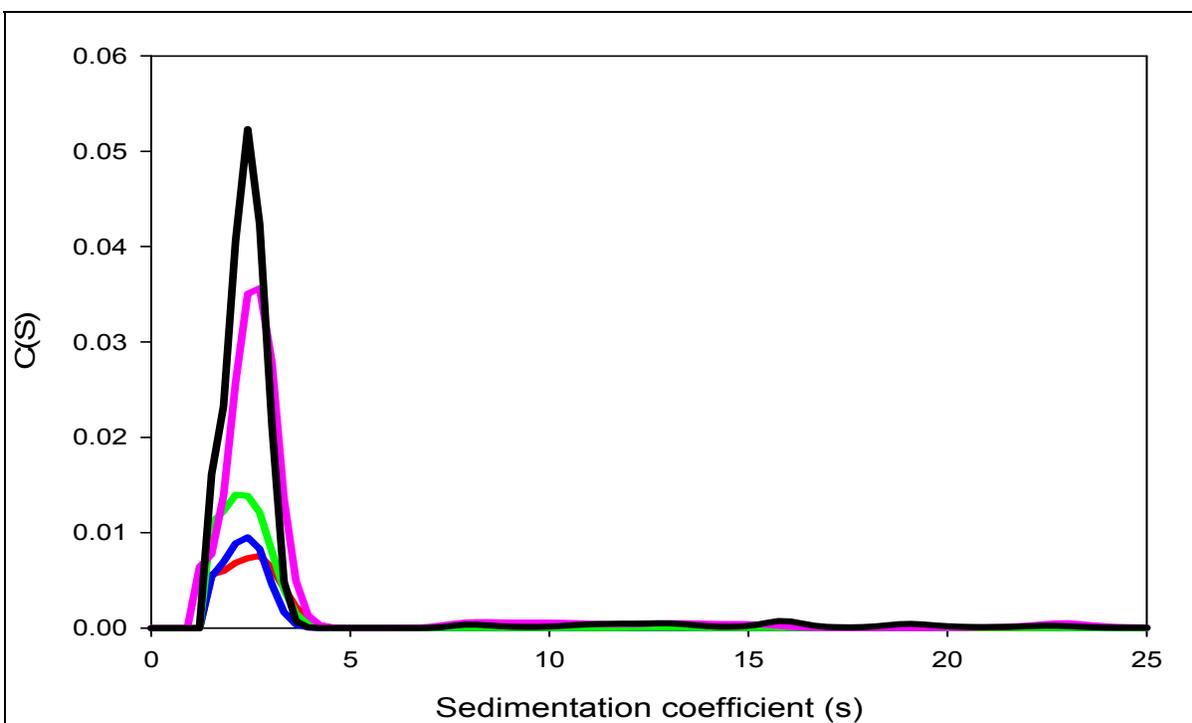


Figure S5. Sedimentation coefficients (*S*) of different concentrations (1-5 mg L⁻¹) of the polymeric nanoparticles (allospheres) as measured by SV-AUC using interference detection at 40000 rpm. Red line corresponds to 1 mg L⁻¹, blue line to 2 mg L⁻¹, green line to 3 mg L⁻¹, pink line to 4 mg L⁻¹ and black line to 5 mg L⁻¹.

In order to decrease the detectable concentrations further, it would be necessary to improve the sensitivity of detection. Although the bare allospheres do not absorb light, it is possible to add a fluorophore to their structure, either by encapsulation (Nile red) or via adsorption (Rhodamine RG6, Rhodamine 110 and Rhodamine 123) (55). Although a similar particle size was indeed observed following the adsorption of a small amount of 7.6 ± 1.4 nm (Figure S6), surprisingly, no gain in sensitivity was attained. For the Nile Red encapsulated allospheres, similar diameters were obtained using absorbance detection but fluorescence (excitation =488 nm) was below detection limits of the instrument. Accordingly, given that the interference detector did not require the addition of a potentially perturbing fluorophore, the remainder of the experiments were performed using interference optics.

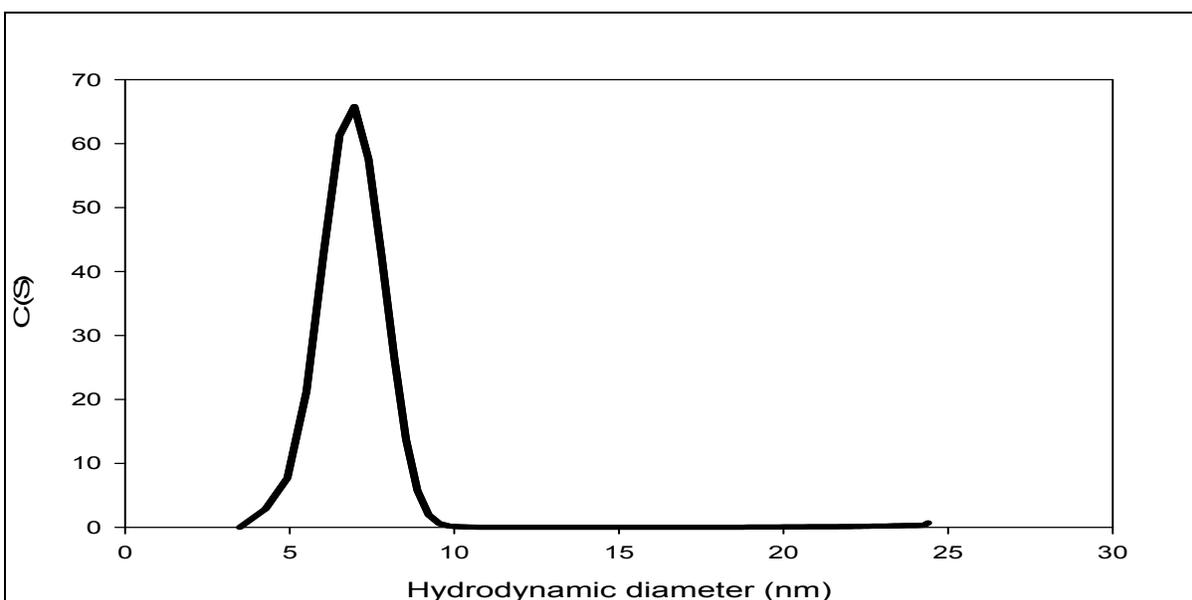


Figure S6. Hydrodynamic diameter of the allospheres (5 mg L^{-1}) obtained by adding 10^{-7} M of rhodamine 123 to the allospheres prior to their measurement by SV-AUC using fluorescence detection.

For 5 mg L^{-1} of the allospheres, the raw data corresponding to interference detection of Figure S6 is presented in Fig. S7.

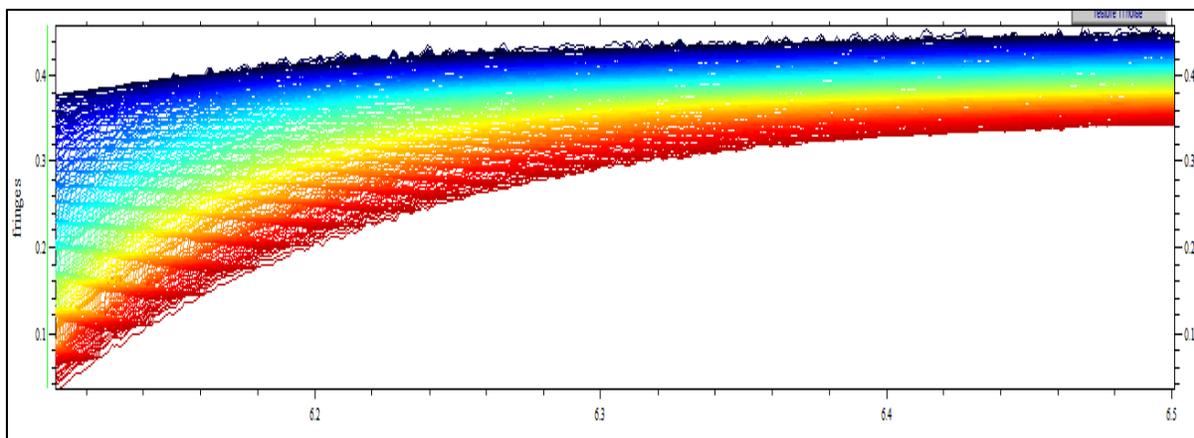


Figure S7. Raw data of fringes vs. position in the centrifugation cell for 5 mg L⁻¹ of the allospheres (pH 6.0).

S3. Comparison of allosphere sizes obtained by DLS and AUC- role of particle concentration

Particle size distributions of the allospheres were determined using both dynamic light scattering (DLS) and AUC at five pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0) (Figure 1, Figures S8 and S9). For 5 mg L⁻¹ of the allospheres, AUC measurements were fairly straightforward (Figure S8), showing particle diameters that varied little with pH. On the other hand, there was not sufficient scattering by the allospheres at 5 mg L⁻¹ to perform DLS experiments and thus concentrations were increased to 200 mg L⁻¹. At the higher concentration, two peaks were observed at pH 7.0 and 8.0: one with a number average diameter of 8.3 ± 0.9 nm corresponding to the monomer and the other at much larger sizes (ca. 185 nm, Figure S9). At the lower pH values (4.0, 5.0, 6.0), agglomeration/sedimentation was so important that suspended particle concentrations decreased below DLS detection limits. On the other hand, the larger agglomerates could be observed by AUC when centrifuging at very low speeds. For example, for 5 mg L⁻¹ of the allospheres at pH 6.0, a hydrodynamic diameter of 171.7 ± 14.6 nm with a signal intensity (C(S)) of 3.2×10^{-6} (Figure S10) was obtained when centrifugation was performed at 5000 rpm. When the rotational speed was increased to 40000 rpm for the same sample, a signal intensity of 5.1×10^{-2} was measured, indicating that 99.9% of the particle mass consisted of non-agglomerated allospheres (7.3 ± 2.9 nm; Figure S11). At 200 mg L⁻¹, similar sizes were observed, i.e. a peak intensity,

$C(S)$, of 0.18 for the peak centered at 9.4 ± 2.5 nm and an intensity of 2.1×10^{-5} at 157 ± 11.9 nm (Figure S12, S13).

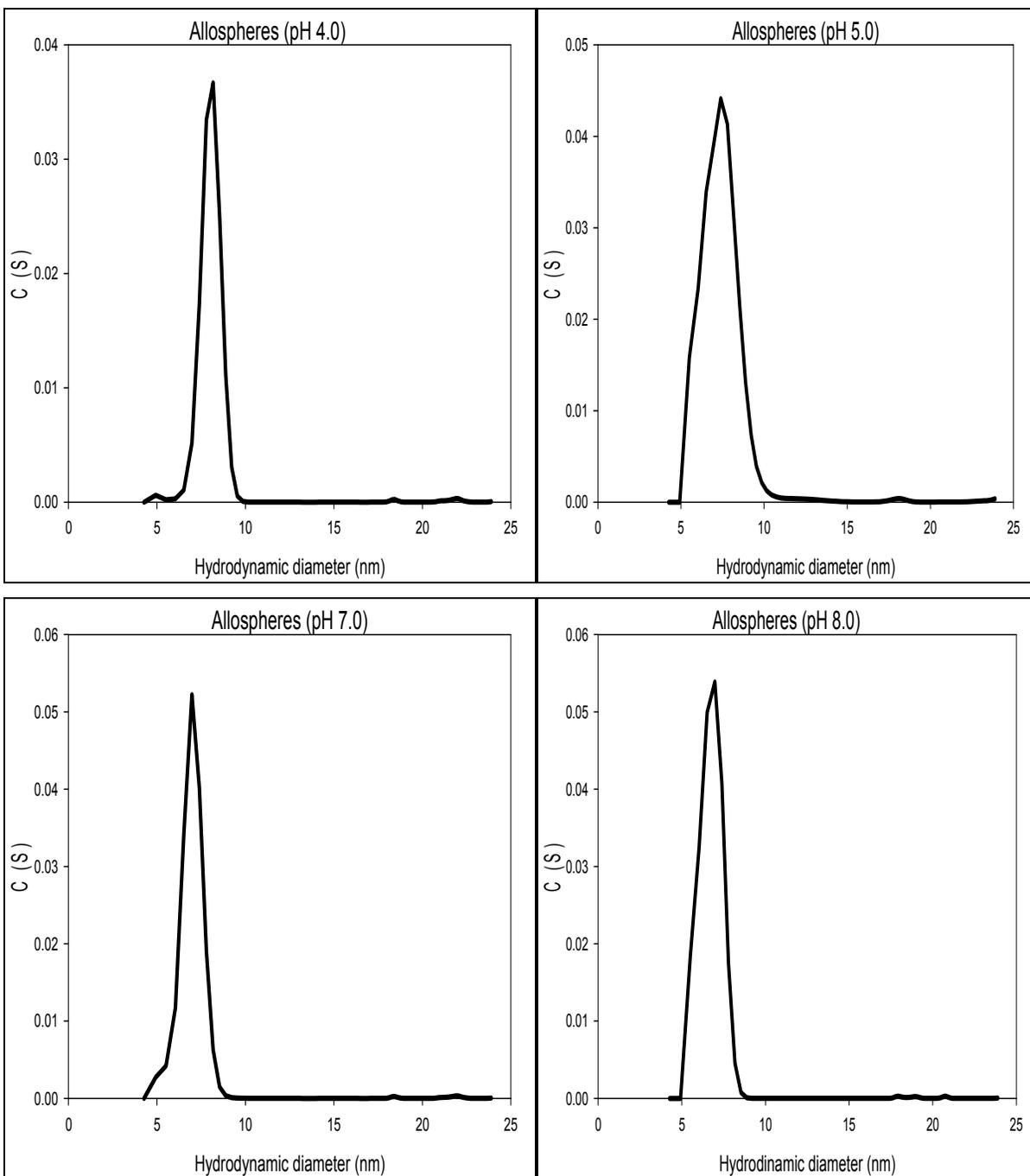


Figure S8. Hydrodynamic diameters of 5 mg L^{-1} of the polymeric nanoparticles (allospheres) at different pH (4.0, 5.0, 7.0, 8.0) as obtained by SV-AUC using interference detection. Results for pH 6.0 are found in the body of the main paper.

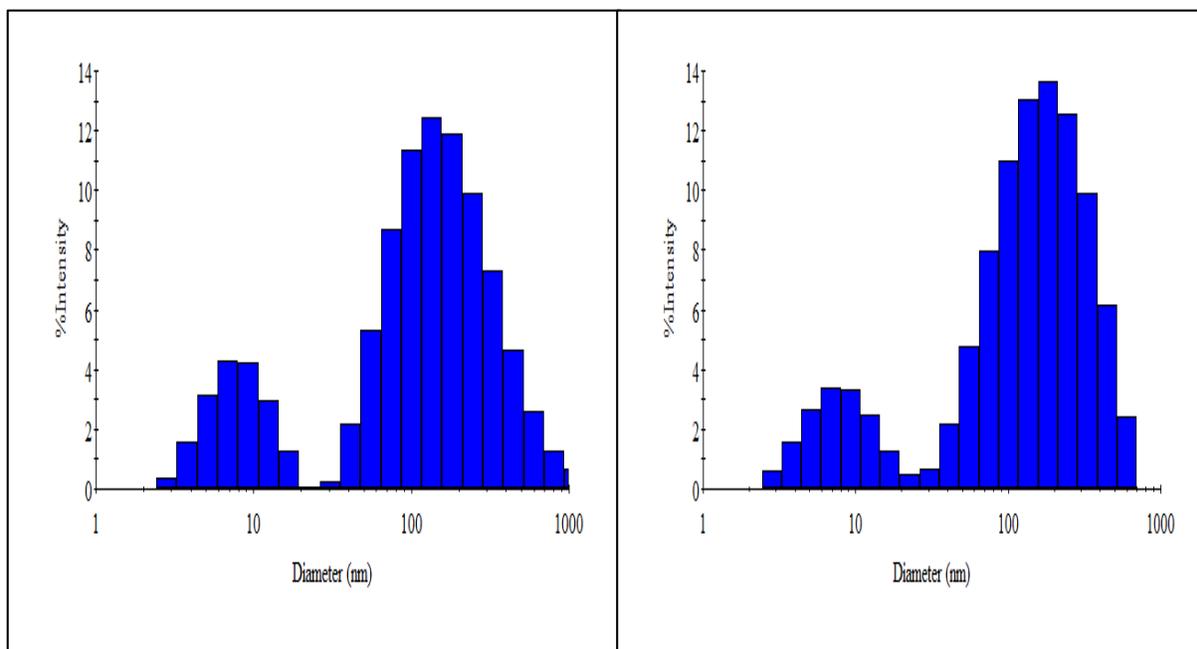


Figure S9. Hydrodynamic diameters of 200 mg L⁻¹ of the polymeric nanoparticles (allospheres) at pH 7.0 and 8.0 as obtained determined by DLS.

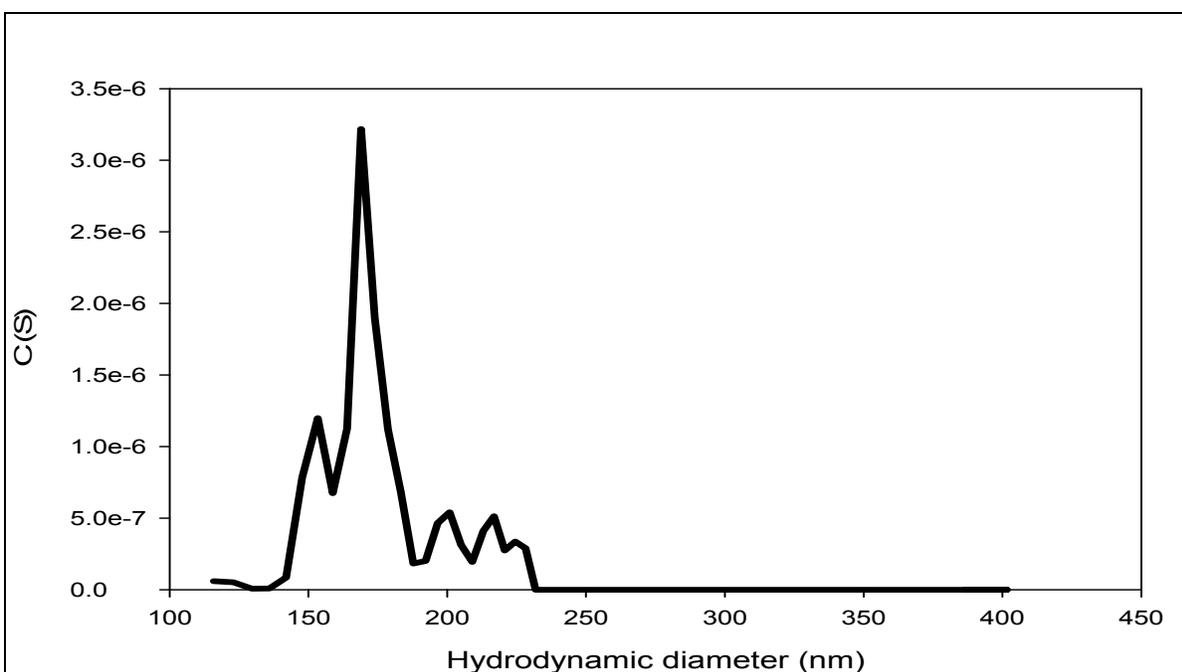


Figure S10. Hydrodynamic diameters of 5 mg L⁻¹ of the polymeric nanoparticles (allospheres) at pH 6.0 as determined by AUC (5000 rpm, RCF = 2016 x g).

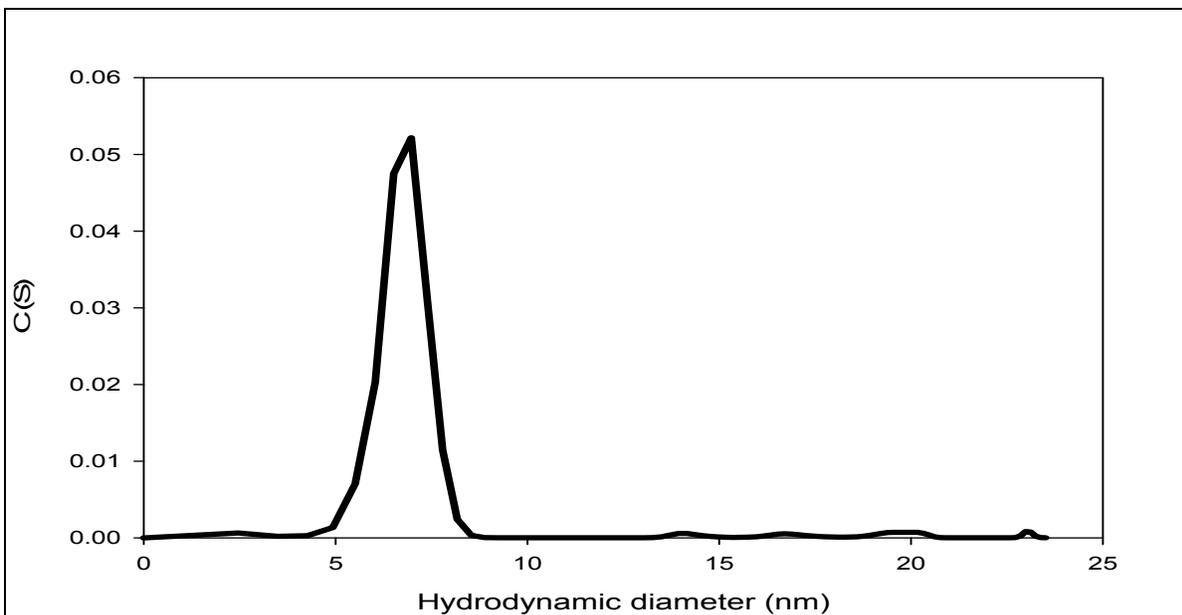


Figure S11. Hydrodynamic diameters of 5 mg L⁻¹ of the polymeric nanoparticles (allospheres) at pH 6.0 as determined by AUC (40000 rpm, RCF = 129024 x g).

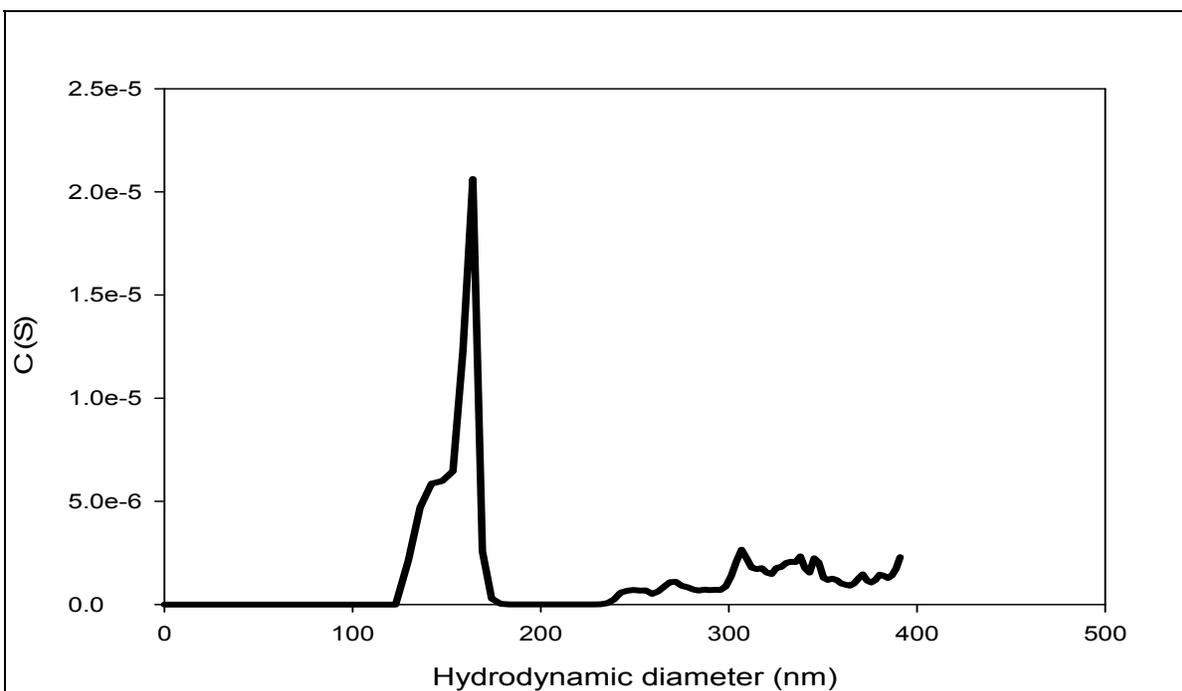


Figure S12. Hydrodynamic diameters of 200 mg L⁻¹ of the polymeric nanoparticles (allospheres) at pH 6.0 as determined by AUC (5000 rpm, RCF = 2016 x g).

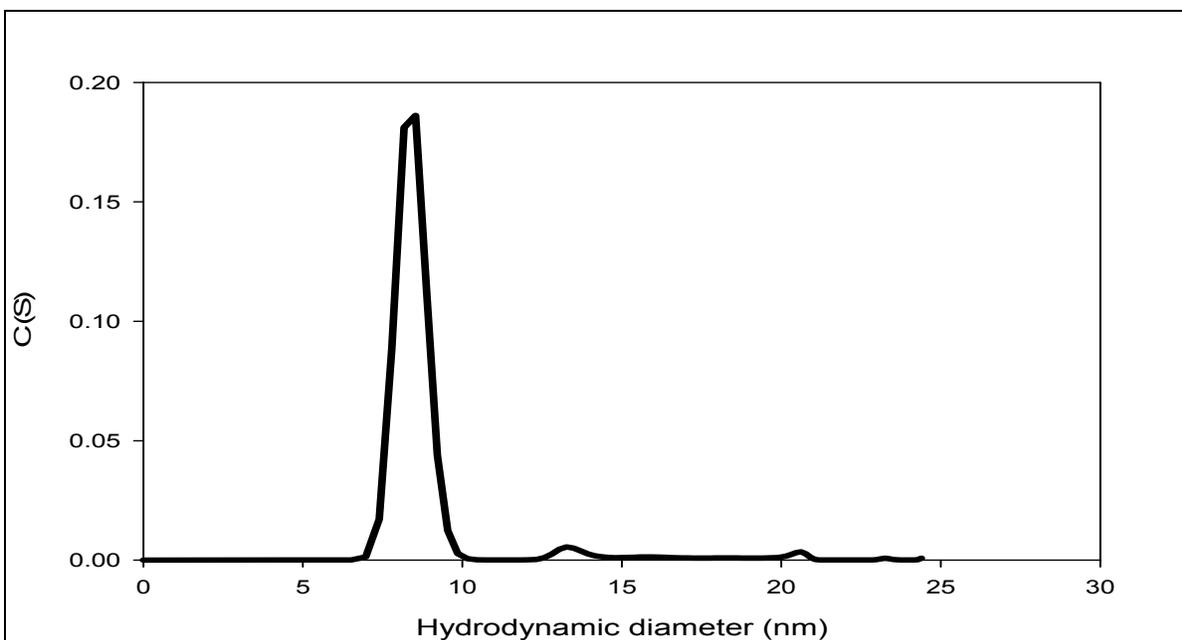


Figure S13. Hydrodynamic diameters of 200 mg L⁻¹ of the polymeric nanoparticles (allospheres) at pH 6.0 as determined by AUC (40000 rpm, RCF = 129024 x g).

S4. Size of the soil humic acid determined by fluorescence correlation spectroscopy (FCS)

The FCS technique has been described in detail elsewhere (102), and been used previously to determine the diffusion coefficients of the humic substances (78). In brief, the technique is based on the analysis of fluorescence intensity fluctuations of molecules passing through a small (ca. 1 μm³), illuminated (Ar⁺, 488 nm) volume defined by confocal optics. Temporal fluctuations in the measured fluorescence intensity in the sample volume are used to derive an autocorrelation curve. In absence of any other processes that affect sample fluorescence, the autocorrelation curve will be related to the translational diffusion of the fluorescent sample through the confocal volume. Diffusion times of the HS are obtained from a best fit of the autocorrelation function (Eq. 1) following calibration of the sample volume using rhodamine-6G, which has a known diffusion coefficient of 4.0 x 10⁻¹⁰ m² s⁻¹ (55). Each data point was determined as the mean of three replicates, with run times of 120 s that were employed to reduce noise in the autocorrelation curves, mainly due to the low quantum yield of the HS. All FCS measurements were performed at 25 °C in an eight-welled, covered FCS cell.

The autocorrelation function can be described by the following equation:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \times \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1)$$

where τ is the diffusion time, t is the acquisition time, $F(t)$ is the fluorescence at time t and $\langle F(t) \rangle$ is the mean value. From the experimentally determined diffusion times through a calibrated confocal volume, it is possible to determine the diffusion coefficients, D , of the soil humic acids. Diffusion coefficients are related to their hydrodynamic diameters via the Stokes-Einstein equation (Eq. 2), which assumes that they are spherical, hard spheres:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2)$$

where d_H is the hydrodynamic diameter, k is the Boltzmann constant, T is the temperature in Kelvin, and η is the viscosity of the medium.

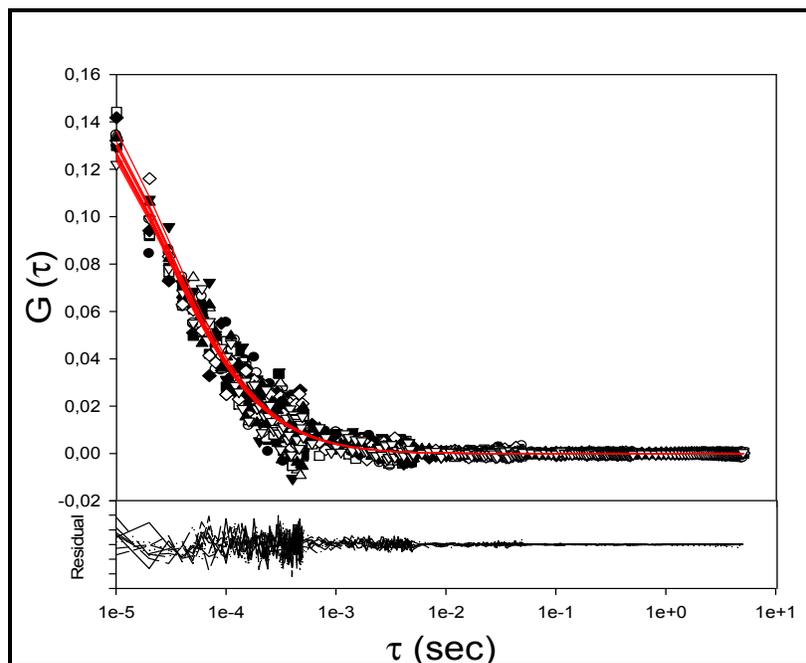


Figure. S14. Autocorrelation curve resulting from the fluorescence intensity fluctuations of 20 mg L⁻¹ of the Elliot soil humic acid.

Mean hydrodynamic diameters of 1.7 ± 0.2 nm were found for the humic acids using an excitation wavelength of 488 nm and emission bands of either 503-530 nm or 607-683 nm, in line with literature values of 2.0 nm obtained previously for a different soil humic acid (97)

2.5 Composition of the natural water samples

Samples from the effluent of the Montreal wastewater treatment plant (pH 7.2) and from the Des Prairies River (pH 7.3) were collected and spiked with allospheres prior to their analysis by AUC. The major ion content of the two samples is presented in Table S4. Analysis of dissolved organic carbon (DOC) gave 7.58 and 7.38 mg C L⁻¹ for the river water and the wastewater effluent, respectively.

Table S4. Major ions in the two natural waters.

Sample ID	Na (mmol/L)	Mg (mmol/L)	K (mmol/L)	Ca (mmol/L)
Surface water	0.227 ± 0.005	0.107 ± 0.003	0.017 ± 0.002	0.164 ± 0.004
Effluent water	5.542 ± 0.289	0.828 ± 0.039	0.379 ± 0.023	0.993 ± 0.035

Chapitre 4: Conclusion Générale

Cette étude a permis de constater que l'ultracentrifugation analytique est un outil puissant pour la caractérisation des nanoparticules. En effet, les capacités de l'AUC pour la caractérisation des nanoparticules polymériques (Alloperse[®]) dans différentes conditions environnementales ont été évaluées. Quelques mesures complémentaires ont été effectuées par DLS et FCS afin de valider cette étude. En dépit des limites de détection de la technique, les résultats étaient similaires aux autres techniques et faciles à interpréter. Dans l'ensemble, l'AUC est une technique qui est très utile pour caractériser et détecter les plus petites nanoparticules, surtout par rapport aux autres techniques. Il s'agit d'une méthode non destructive, rapide et simple qui n'a besoin de qu'un petit volume d'échantillon (400 μL). Afin d'étudier l'effet de paramètres environnementaux (pH, force ionique, la concentration du calcium et de la matière organique naturelle) sur les distributions de la taille de nanoparticules allosphères, il était nécessaire d'optimiser l'AUC dans des expériences préliminaires. Les résultats obtenus ont montré que : i) à un pH entre 4 et 8 les allosphères (5 mg L^{-1}) sont très stables; ii) la présence de cation Na^+ ou de Ca^{2+} à des concentrations environnementales (moins de 50 mM) génère une modification négligeable du d_H des allosphères ; iii) la matière organique naturelle n'affecte pas la stabilité de la suspension colloïdale. Ces informations sont très utiles pour évaluer le destin des allosphères dans les sols.

Pourtant, il reste encore beaucoup d'études à réaliser pour évaluer le risque des allosphères dans l'environnement. À titre d'exemple, l'étude de l'effet de diverses nanoformulations de pesticides serait utile. De même, des études sur la persistance ou les conditions de stockage optimales pour s'assurer de la stabilité structurale des allosphères dans l'environnement seraient appropriées. Des recherches pour évaluer la taille des nanocapsules complexes, par exemple, lorsqu'un matériel de noyau est lié à des polymères stabilisants seraient intéressantes et utiles.

Finalement, pour réduire l'ambiguïté qui résultent de l'ajustement simultané de la densité des particules et le coefficient de sédimentation, afin d'améliorer la précision des estimations du d_H , il serait possible d'étudier les vitesses de sédimentation des nanoparticules dans plusieurs solvants avec différentes densités.

Bibliographie

1. Ramsden J.J. Nanotechnology: An Introduction. Amsterdam: Elsevier (2011).
2. Farre M, Sanchis J, Barcelo D. Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 2011;30(3):517-27.
3. Kookana R.S, Boxall A.B.A, Reeves P.T, Ashauer R, Beulke S, Chaudhry Q, et al. Nanopesticides: Guiding Principles for Regulatory Evaluation of Environmental Risks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(19):4227-40.
4. Kah M, Beulke S, Tiede K, Hofmann T. Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2013;43(16):1823-67.
5. Kumar S, Bhanjana G, Sharma A, Sidhu M.C, Dilbaghi N. Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2014;101:1061-7.
6. Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*. 2012;14(9).
7. Hu Y, Jiang X.Q, Ding Y, Ge H.X, Yuan Y.Y, Yang C.Z. Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles. *Biomaterials*. 2002;23(15):3193-201.
8. Liufu S.C, Mao H.N, Li Y.P. Adsorption of poly(acrylic acid) onto the surface of titanium dioxide and the colloidal stability of aqueous suspension. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005;281(1):155-63.
9. Tuoriniemi J. New Single Particle Methods for Detection and Characterization of Nanoparticles in Environmental Samples. (2013). Université de Gothenburg, Département de chimie et biologie moléculaire. Rapport de mémoire de maîtrise, 66 pages.
10. Environmental Protection Agency des Etats-Unis (US EPA). Disponible: http://www.epa.gov/pesticides/about/#what_pesticide. [Consulté le 5 Octobre 2013]
11. Guigon E. Transfert des pesticides vers les eaux superficielles et atmosphères; caractérisation et modélisation sur le bassin versant de la Vesle (2006). Université de Pierre et Marie Curie, Département de Géosciences et Ressources Naturelles. Rapport de mémoire de doctorat, 273 pages.
12. Van der Werf HM, Trunen L. The environmental impacts of the production of hemp and flax textile yarn. *Industrial Crops and Products*. 2008;27(1):1-10.

13. Blanchoud H, Barruso E, Chevreuil M, Guery B, Moreau-Guigon E, Schott C, They S, Tournebize J, Aesn, Piren Seine. Les pesticides dans le bassin de la seine comprendre les origines et le transfert des pesticides pour en evaluer l'impact sur l'homme et l'environnement. (2011). Disponible: http://www.sisyphe.upmc.fr/piren/webfm_send/1011. [Consulté le 6 Octobre 2013]
14. Proulx K, Wilkinson K.J. Separation, detection and characterisation of engineered nanoparticles in natural waters using hydrodynamic chromatography and multi-method detection (light scattering, analytical ultracentrifugation and single particle ICP-MS). *Environmental Chemistry*. 2014;11(4):392-401.
15. Yu S, Yin Y. Hightly Dynamique PVP-Coated Silver Nanoparticles in Acuatic Environments: Chemical and Morphology Change Induced by Oxidation of Ag⁰ and reduction of Ag⁺. 2013.
16. Feng Q.L, Wu J, Chen G.Q, Cui F.Z, Kim T.N, Kim J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;52(4):662-8.
17. Bhattacharyya A, Bhaumik A, Rani P.U, Mandal S, Epidi T.T. Nano-particles - A recent approach to insect pest control. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(24):3489-93.
18. French R.A, Jacobson A.R, Kim B, Isley S.L, Penn R.L, Baveye P.C. Influence of Ionic Strength, pH, and Cation Valence on Aggregation Kinetics of Titanium Dioxide Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*. 2009;43(5):1354-9.
19. Kuemmerer K, Menz J, Schubert T, Thielemans W. Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. *Chemosphere*. 2011;82(10):1387-92.
20. Sharma V.K. Aggregation and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environment-A Review. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. 2009;44(14):1485-95.
21. Wilkinson K.J. and Lead J.R. *Environmental Colloids and Particles. Analytical and physical chemistry of environmental systems*, ed. J. Buffle et H.P. van Leeuwen. Vol. 10. 2007, England: John Wiley and Sons. 687.
22. Salager J. L. Anton R. E, Anderez J. M, Aubry J. M. Formulation des microémulsions par la méthode HLD, *Techniques de l'Ingénieur*, Vol. Génie des Procédés J2. 2001,157, 1-20
23. Carlucci A.M, Cicconi M. and Bregni C. Microemulsions Used as Vehicles for Administration of Drugs, *Acta Farm. Bonaerense*. 2004; **23** (4): 550-7
24. Wang L, Li X, Zhang G, Dong J, Eastoe J. Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2007;314(1):230-5.

25. Sonnevile-Aubrun O., Simonnet J.T, L'Alloret F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2004;108:145-9.
26. Tadros T, Izquierdo P, Esquema J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2004; 108-109: 303-18.
27. Muller, R. H, Junghanns J.-U., A.H.. Drug nanocrystals/nanosuspensions for the delivery of poorly soluble drugs (2006). In V. P. Torchilin (Ed.), *Nanoparticles as drug carriers* (pp. 307–328). London, England: Imperial College Press.
28. Kah M, Hofmann T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. *Environment International*. 2014;63:224-35.
29. Goutayer M. Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence *in vivo*. (2008). Université de Pierre et Marie Curie, Département de Chimie Physique et Chimie Analytique. Rapport de mémoire de doctorat, 241 pages.
30. Llinàs M.C, Sanchez D. Silica nanoparticles: preparation and applications in biomedicine. *Afinidad LXXI*, 565. 2014;20-31
31. Liu F, Wen L-X, Li Z-Z, Yu W, Sun H-Y, Chen J-F. Porous hollow silica nanoparticles as controlled delivery system for water-soluble pesticide. *Materials Research Bulletin*. 2006;41(12):2268-75.
32. Raso M.A. Preparation and characterization of new nanocomposites from layered double hydroxides (LDHs). (2007) .Université Polytechnique Catalunya, Département de Chimie. Rapport de mémoire de doctorat, 218 pages.
33. Park M, Lee C-I, Seo Y.J, Woo S.R, Shin D, Choi J. Hybridization of the natural antibiotic, cinnamic acid, with layered double hydroxides (LDH) as green pesticide. *Environmental Science and Pollution Research*. 2010;17(1):203-9.
34. Qiu D, Li Y, Fu X, Jiang Z, Zhao X, Wang T. Controlled-release of Avermectin from Organically Modified Hydrotalcite-like Compound Nanohybrids. *Chinese Journal of Chemistry*. 2009; 27(3):445-51.
35. Bertolini A.C, Siani A.C, Grosso C.R.F. Stability of monoterpenes encapsulated in gum Arabic by spray-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(2):780-5.
36. Yang, F.L, Li X.G, Zhu, F, Lei C.L. Structural Characterization of Nanoparticles Loaded with Garlic Essential Oil and Their Insecticidal Activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(21):10156-62.

37. Kirby G.H, Harris D.J, Li Q, Lewis J.A. Poly(acrylic acid)-poly(ethylene oxide) comb polymer effects on BaTiO₃ nanoparticle suspension stability. *Journal of the American Ceramic Society*. 2004;87(2):181-6.
38. Domingos R.F, Baalousha M.A, Ju-Nam Y, Reid M.M, Tufenkji N, Lead J.R. Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environmental Science & Technology*. 2009;43(19):7277-84.
39. Powers K.W, Palazuelos M, Moudgil B.M, Roberts S.M. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology*. 2007;1(1):42-51.
40. Wilkinson K.J. 2013. Emerging issues in ecotoxicology: Characterization of nanoparticles in aqueous media. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology* (Férard, J.F. and Blaise, C., editors). pp 395-406.
41. Altikatoglu M, Tavukcuoglu O, Mustafaev M. Characterization of Water-Soluble Complexes of Polyacrylic Acid with alpha-Amylase from *Aspergillus oryzae*. *Protein Journal*. 2010;29(2):120-6.
42. Lechner M.D, Coelfen H, Mittal V, Voelkel A, Wohlleben W. Sedimentation measurements with the analytical ultracentrifuge with absorption optics: influence of Mie scattering and absorption of the particles. *Colloid and Polymer Science*. 2011;289(10):1145-55.
43. Balbo A, Schuck P. Analytical Ultracentrifugation in the Study of Protein Self-association and Heterogeneous Protein-Protein Interactions. Inc; Golemis, E. and Adams, P.D. Protein-Protein Interactions. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor New York pp. 253-277.
44. Lebowitz J, Lewis MS, Schuck P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Science*. 2002;11(9):2067-79.
45. Ralston G. Introduction to Analytical Ultracentrifugation, *Beckman Coulter Inc. Fullerton, US*. Disponible; <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=361847.pdf>. [Consulté le 12 Mai 2012]
46. Scott D.J, Harding S.E, Rowe A.J, R. S. O. Chemistry, Analytical ultracentrifugation: techniques and methods: RSC Publishing, 2005
47. Howlett G.J, Minton A.P, Rivas G. Analytical ultracentrifugation for association and assembly the study of protein. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006;10(5):430-6.
48. Carney R.P, Kim J.Y, Qian H, Jin R, Mehenni H, Stellacci F. Determination of nanoparticle size distribution together with density or molecular weight by 2D analytical ultracentrifugation. *Nature Communications*. 2011;2:8

49. Cole J.L, Hansen J.C. Analytical ultracentrifugation as a contemporary biomolecular research tool. *Journal of biomolecular techniques : JBT*. 1999;10(4):163-76.
50. Lam. S. Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation (SV-AUC) for characterizing protein aggregates and contaminants in therapeutic proteins (2014). Université Van Amsterdam, Département de Chimie. Rapport de mémoire de maîtrise, 39 pages.
51. Domingos R.F, Simon D.F, Hauser C, Wilkinson K.J. Bioaccumulation and Effects of CdTe/CdS Quantum Dots on *Chlamydomonas reinhardtii* - Nanoparticles or the Free Ions? *Environmental Science & Technology*. 2011;45(18):7664-9.
52. Li L, Hartmann G, Döblinger M, Schuster M. Quantification of nanoscale silver particles removal and release from municipal wastewater treatment plants in Germany. *Environ Sci Technol*, 2013. **47**(13): p. 7317-23
53. Dam J, Schuck P. Calculating sedimentation coefficient distributions by direct modeling of sedimentation velocity concentration profiles. *Numerical Computer Methods, Pt E*. 2004;384:185-212.
54. Niebel, Y. Analyse des Complexes Oligodésoxyribonucléotide/Chitosan par Ultracentrifugation Analytique (2013). Université École Polytechnique de Montréal, Département de Génie Biomédical. Rapport de mémoire de maitrise, 64 pages
55. Gendron P.O, Avaltroni F, Wilkinson K.J. Diffusion Coefficients of Several Rhodamine Derivatives as Determined by Pulsed Field Gradient-Nuclear Magnetic Resonance and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *J Fluoresc*. 2008;18(6):1093-101.
56. Pekar A, Sukumar M. Quantitation of aggregates in therapeutic proteins using sedimentation velocity analytical ultracentrifugation: Practical considerations that affect precision and accuracy. *Analytical Biochemistry*. 2007;367(2):225-37.
57. Polson A. Variation of Sedimentation Coefficient with Rotor Velocity. *Biochemical Journal*. 1967;104(2):410-&.
58. Charlwoo P. Effect of Rotor Velocity on Sedimentation Coefficients. *Biochemical Journal*. 1970;120(1):113-&.
59. Tuoriniemi J. New Single Particle Methods for Detection and Characterization of Nanoparticles in Environmental Samples. 2013.
60. Hu L, Cui Y. Energy and environmental nanotechnology in conductive paper and textiles. *Energy & Environmental Science*. 2012;5(4):6423-35.
61. Cao Y.S, Huang L, Chen J.X, Liang J, Long S.Y, Lu Y.T. Development of a controlled release formulation based on a starch matrix system. *Int J Pharm*. 2005;298(1):108-16.

62. Gallego-Urrea J.A, Tuoriniemi J, Hasselov M. Applications of particle-tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 2011;30(3):473-83.
63. Kumari A, Yadav S.K. Nanotechnology in Agri-Food Sector. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(8):975-84.
64. Kah M, Hofmann T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. *Environment International*. 2014;63:224-35.
65. Gottschalk F, Sun T, Nowack B. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environmental Pollution*. 2013;181:287-300.
66. Gogos A, Knauer K, Bucheli T.D. Nanomaterials in Plant Protection and Fertilization: Current State, Foreseen Applications, and Research Priorities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(39):9781-92.
67. Savolainen K, Alenius H, Norppa H, Pylkkanen L, Tuomi T, Kasper G. Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies-A review. *Toxicology*. 2010;269(2-3):92-104.
68. Ortega A, Pamies R, Zhu K.Z, Kjoniksen A.L, Nystrom B, Torre J.G. Characterization of low molecular mass thermosensitive diblock copolymers and their self-assembly by means of analytical ultracentrifugation. *Colloid and Polymer Science*. 2012;290(4):297-306.
69. Mittal V, Lechner M.D. Sedimentation studies of single and bi-component polystyrene solutions in analytical ultracentrifugation by comparison of two analysis methods: effect of polymer concentration. *Polym Bull*. 2011;67(5):831-41.
70. Haranas I, Gkigkitzis I, Zouganelis G.D. g Dependent particle concentration due to sedimentation. *Astrophys Space Sci*. 2012;342(1):31-43.
71. Lead J.R, Wilkinson K.J. Aquatic colloids and nanoparticles: Current knowledge and future trends. *Environ Chem*. 2006;3(3):159-71
72. Anderson, D. Vive Crop Protection, personal communication (Sept. 2014)
73. Leclerc S, Wilkinson K.J. Bioaccumulation of Nanosilver by *Chlamydomonas reinhardtii*-Nanoparticle or the Free Ion? *Environmental Science & Technology*. 2014;48(1):358-64.
74. Schuck P, Balbo A, Brown P.H, Zhao H. (2010) Analytical ultracentrifugation. In: Meyers RA (ed.) Encyclopedia of analytical chemistry. John Wiley, Chichester, pp 21–52.
75. Software SEDFIT AND SEDPHAT. Available at <https://sedfitsedphat.nibib.nih.gov/software/default.aspxI>. [Verified 7 March 2013].

76. Zhao H.Y, Berger A.J, Brown P.H, Kumar J, Balbo A, May C.A. Analysis of high-affinity assembly for AMPA receptor amino-terminal domains (vol 139, pg 371, 2012). *J Gen Physiol*. 2013;141(6):747-9.
77. Nontapot K, Rastogi V, Fagan J.A, Reipa V. Size and density measurement of core-shell Si nanoparticles by analytical ultracentrifugation. *Nanotechnology*. 2013;24(15).
78. Lead J, Wilkinson K.J, Starchev K, Canonica S, Buffle J. Diffusion coefficients of humic substances as determined by fluorescence correlation spectroscopy. *Environ Sci Technol*. 2000;34:1365-9.
79. Sarkar D. Somasundaran P. Conformational dynamics of poly(acrylic acid). A study using surface plasmon resonance spectroscopy. *Langmuir*. 2004;20(11):4657-64.
80. Petosa A.R, Oehl C. Rajput F. Tufenkji N. Mobility of nanosized cerium dioxide and polymeric capsules in quartz and loamy sands saturated with model and natural groundwaters. *Water Research*. 2013;47(15):5889-900.
81. Quevedo I.R, Olsson A.L.J, Tufenkji N. Deposition Kinetics of Quantum Dots and Polystyrene Latex Nanoparticles onto Alumina: Role of Water Chemistry and Particle Coating. *Environmental Science & Technology*. 2013;47(5):2212-20.
82. Jiang J, Oberdorster G, Biswas P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*. 2009;11(1):77-89.
83. Buffle J, Wilkinson K.J, Stoll S, Filella M, Zhang J.W. A generalized description of aquatic colloidal interactions: The three-colloidal component approach. *Environmental Science & Technology*. 1998;32(19):2887-99.
84. Koopal L.K, Avena M.J. A simple model for adsorption kinetics at charged solid-liquid interfaces. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp*. 2001;192(1-3):93-107.
85. Duval, J., K.J. Wilkinson, J. Buffle and H.P. van Leeuwen. 2005. Humic substances are soft and permeable spheres: evidence from their electrophoretic mobilities. *Environ. Sci. Technol*. 39: 6435-6445.
86. French R.A, Jacobson A.R, Kim B, Isley S.L, Penn R.L, Baveye P.C. Influence of Ionic Strength, pH, and Cation Valence on Aggregation Kinetics of Titanium Dioxide Nanoparticles 2009. *Environmental Science & Technology*;43(5):1354-9.
87. Saleh N, Kim H-J, Phenrat T, Matyjaszewski K, Tilton R.D, Lowry G.V. Ionic strength and composition affect the mobility of surface-modified Fe-0 nanoparticles in water-saturated sand columns. *Environmental Science & Technology*. 2008;42(9):3349-55.

88. Han Y, Kim D, Hwang G, Lee B, Eom I, Kim P.J. Aggregation and dissolution of ZnO nanoparticles synthesized by different methods: Influence of ionic strength and humic acid. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp.* 2014;451:7-15.
89. Delay M, Dolt T, Woellhaf A, Sembritzki R, Frimmel F.H. Interactions and stability of silver nanoparticles in the aqueous phase: Influence of natural organic matter (NOM) and ionic strength. *Journal of Chromatography A.* 2011;1218(27):4206-12.
90. Domingos R.F, Tufenkji N, Wilkinson K.J. Aggregation of Titanium Dioxide Nanoparticles: Role of a Fulvic Acid. *Environmental Science & Technology.* 2009;43(5):1282-6.
91. Bian S-W, Mudunkotuwa I.A, Rupasinghe T, Grassian V.H. Aggregation and Dissolution of 4 nm ZnO Nanoparticles in Aqueous Environments: Influence of pH, Ionic Strength, Size, and Adsorption of Humic Acid. *Langmuir.* 2011;27(10):6059-68.
92. Jiang X.J, Tong M.P, Kim H. Influence of natural organic matter on the transport and deposition of zinc oxide nanoparticles in saturated porous media. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2012;386:34-43.
93. Tong M.P, Zhu P.T, Jiang X.J, Kim H. Influence of natural organic matter on the deposition kinetics of extracellular polymeric substances (EPS) on silica. *Colloid Surf B-Biointerfaces.* 2011;87(1):151-8.
94. Louie S.M, Tilton R.D, Lowry G.V. Effects of Molecular Weight Distribution and Chemical Properties of Natural Organic Matter on Gold Nanoparticle Aggregation. *Environmental Science & Technology.* 2013;47(9):4245-54.
95. Fabrega J, Fawcett S.R, Renshaw J.C, Lead J.R. Silver Nanoparticle Impact on Bacterial Growth: Effect of pH, Concentration, and Organic Matter. *Environmental Science & Technology.* 2009;43(19):7285-90.
96. Zhu M, Wang H.T, Keller A.A, Wang T, Li F.T. The effect of humic acid on the aggregation of titanium dioxide nanoparticles under different pH and ionic strengths. *Sci Total Environ.* 2014;487:375-80.
97. Cameron R.S, Thornton B.K, Swift R.S, Posner A.M. Molecular-Weight and Shape of Humic Acid from Sedimentation and Diffusion Measurements on Fractionated Extracts. *Journal of Soil Science.* 1972;23(4):394-408.
98. Elemental Composition and Stable Isotopic Ratios of IHSS Samples.
Available at <http://www.humicsubstances.org/elements.html>[Verified 23 Feb. 2014].
99. Acidic Functional Groups of IHSS samples.
Available at <http://www.humicsubstances.org/acidity.html> Verified 23 Feb. 2014]

100. Cole J.L, Lary J.W, Moody T.P, Laue T.M. Analytical ultracentrifugation: Sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. In: Correia JJ, Detrich HW, editors. Biophysical Tools for Biologists: Vol 1 in Vitro Techniques. *Methods in Cell Biology*. 842008. p. 143-79.
101. Peulen T.O, Wilkinson K.J. Diffusion of Nanoparticles in a Biofilm. *Environ Sci Technol*. 2011;45(8):3367-73.
102. Starchev K, Wilkinson K.J, Buffle J. Application of FCS to the study of environmental systems. *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Applications*. 2001;65:251-75.

