



Composites teeth for Limpets

Asa H. Barber, Dun Lu and Nicola M. Pugno

School of Engineering, University of Portsmouth,
School of Engineering and Materials Science, Queen Mary University of London
Laboratory of Bio-Inspired and Graphene Nanomechanics, Department of Civil,
Environmental and Mechanical Engineering, Università di Trento



Structure of *Patella vulgata* teeth
Struttura del dente della patella comune (Patella vulgata)

Introduction

The teeth of limpets exploit distinctive composite nanostructures consisting of high volume fractions of reinforcing goethite

nanofibres within a softer protein phase to provide mechanical integrity when rasping over rock surfaces during feeding. The tensile strength of discrete volumes

of limpet tooth material measured using in situ atomic force microscopy was found to range from 3.0 to 6.5 GPa and was independent of sample size. These observations highlight an absolute material tensile strength that is the highest recorded for a biological material, outperforming the high strength of spider silk currently considered to be the strongest natural material, and approaching values comparable to those of the strongest man-made fibres.

This considerable tensile strength of limpet teeth is attributed to a high mineral volume fraction of reinforcing goethite nanofibres with diameters below a defect-controlled critical size, suggesting that natural design in limpet teeth is optimized

towards theoretical strength limits.

Composite structures are widespread in nature and are ubiquitous in mineralized tissue where protein-based polymer frameworks are reinforced with a stronger and stiffer mineral phase. These composite structures often have a distinct mechanical function and have led to a number of engineering principles being applied to explain resultant structure-function behaviour in biological organisms. More recent concepts have examined the potential of biology in controlling the size of constituents in natural composite structures particularly for enhanced mechanical properties at small length scales. Specifically, the reinforcing mineral phase in



Denti in composito: le Patelle

Introduzione

Le "denti" delle patelle sfruttano specifiche nanostrutture composite costituite da frazioni ad alto volume di nanofibre di rinforzo di goethite all'interno di una fase proteica più morbida per garantire l'integrità meccanica quando grattano le superfici rocciose alimentandosi. La resistenza alla trazione di volumi discreti di materiale costituenti i denti delle patelle, misurata in situ utilizzando il microscopio atomico è risultata in 3,0-6,5 GPa ed è indipendente dalle dimensioni del campione. Queste osservazioni evidenziano una resistenza assoluta alla trazione che è la più alta registrata per un materiale

biologico, superando perfino l'elevata resistenza della seta di ragno fino a ora considerato il materiale naturale più resistente, e si avvicina a valori paragonabili a quelli delle fibre artificiali più resistenti. Questa notevole resistenza alla trazione dei "denti" delle patelle è attribuita ad una percentuale in volume del minerale di rinforzo in nanofibre di goethite, con diametri inferiori alla dimensione critica, suggerendo che il design naturale dei denti delle patelle è ottimizzato verso i limiti teorici di resistenza. Le strutture composite sono diffuse in natura e

sono onnipresenti nei tessuti mineralizzati in cui strutture polimeriche a base di proteine sono rinforzate con una fase minerale più resistente e più rigida. Queste strutture composite hanno spesso una ben definita funzione meccanica e hanno portato a una serie

di principi di ingegneria applicati per spiegare il risultante comportamento strutturale/funzionale in organismi biologici. Concetti più recenti hanno esaminato il potenziale che ha la biologia nel controllo delle dimensioni dei componenti in strutture composite naturali particolarmente per migliorare le proprietà meccaniche. In particolare, la fase minerale di rinforzo, in molti organismi, si avvicina a scale nanometriche, almeno in una dimensione, cosa che si pensa sia un modo per aumentare la resistenza ai difetti, per migliorare la resistenza alla trazione del tessuto mineralizzato. L'aumento della resistenza a trazione del materiale grazie alla



Asa H. Barber, Dun Lu and Nicola M. Pugno

School of Engineering, University of Portsmouth,
School of Engineering and Materials Science, Queen Mary University of London
Laboratory of Bio-Inspired and Graphene Nanomechanics, Department of Civil,
Environmental and Mechanical Engineering, Università di Trento

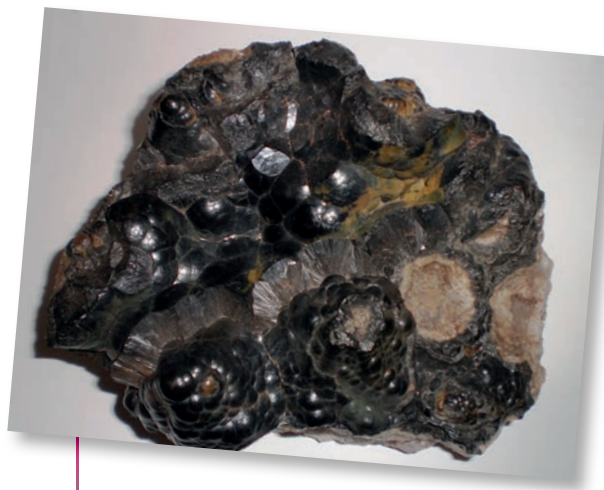
riduzione delle dimensioni, è stato dimostrato storicamente; ricordiamo le osservazioni di Griffith sulla maggiore resistenza della fibra di vetro quando si riduce il diametro, e recentemente grazie alle meccaniche della frattura quantizzata (QFM) e alla Nanoscale Weibull Statistics.

Esempi validi di resistenza eccezionale in materiali naturali sono costituiti dalla seta di ragno che mostra valori di resistenza a trazione fino a 4,5 GPa. I "denti" delle patelle sono un esempio di materiale prodotto biologicamente ottimizzato per resistenza, dovendo questi denti, essere estremamente resistenti e duri per evitare danni catastrofici quando grattano le superfici rocciose per alimentarsi. Studi recenti hanno dimostrato che i denti delle patelle si avvicinano ad un modello naturale quasi ideale di materiale composito

dove è elevato l'apporto di nanofibre minerali di goethite che rinforzano una matrice proteica.

La composizione dei "denti" è costituita principalmente da nanofibre minerali tipicamente di molti micrometri di lunghezza ma solo di poche decine di nanometri di diametro, quindi al di sotto della dimensione critica che favorisce l'insensibilità ai difetti.

Infatti, la densità di difetti nella fase di rinforzo è stata precedentemente mostrata per definire il carico di rottura dei materiali compositi ingegnerizzati contenenti fibre con diametri che sono due volte più grandi delle nanofibre trovate nei denti delle patelle. Questi "denti" presentano quindi una struttura naturale con il potenziale per ottimizzare la resistenza del composito verso un



many organisms approaches nanometre length scales, at least in one-dimension, which has been proposed as promoting flaw insensitivity to increase the tensile strength of mineralized tissue. The enhancement of material tensile strength owing to size effects has additionally been shown historically, including Griffith's observations of increased glass fibre failure stress as their diameters decreased, to more recent quantized fracture mechanics (QFM) extensions from statistical descriptions of

material strength by Nanoscale Weibull Statistics.

Discrete examples of exceptional strength in natural materials are perhaps most prevalent in the silk of spiders with tensile strength

values of up to 4.5 GPa recorded in the literature. Limpet teeth are an example of a material produced biologically that is optimized for strength, especially as these teeth need to be extremely strong and hard to avoid catastrophic failure when rasping over rock surfaces during feeding.

Recent work has shown that the teeth of limpets approximate to an almost ideal model natural composite material where high aspect ratio mineral nanofibres

of goethite reinforce a protein matrix.

The composition of limpet teeth consists primarily of mineral nanofibres typically many micrometres in length but only a few tens of nanometres in diameter, thus below the critical size defined as promoting flaw insensitivity.

Indeed, the density of flaws in the reinforcement phase has been previously shown to define the tensile strength of engineered composite materials containing fibres with diameters that are over two orders of magnitude larger than the nanofibres found in limpet teeth. Limpet teeth therefore present a natural structure with the potential to optimize composite strength towards a theoretical maximum by the incorporation of nanofibre constituents below a critical size that defines tolerance to flaws.

Samples of the limpet *Patella vulgata* were harvested in

Southampton, UK and were immediately rinsed in running tap water in the laboratory and sacrificed during storage in a refrigerator.

The tongue-like radula appendage containing limpet teeth was dissected from the radula end containing the first 5–10 rows of teeth showed evidence of wear from rasping over rock surfaces during feeding and was removed. The remaining radula length was cut into sections with approximate lengths ranging from 3 to 7 mm and mounted onto a standard electron microscope aluminium stub using carbon tape. The radula was allowed to dry on the surface of the carbon tape fixed onto

the aluminium stub. Silver paint was further applied to the base of the tooth to suppress charge accumulation during the electron and ion beam microscopy. Small dimension limpet tooth samples were prepared using FIB techniques previously applied to mineralized.

Mechanical testing of the limpet tooth samples was achieved using a custom-built AFM–SEM set-up.

Tensile testing was achieved by translating the free end of the ‘dog-bone’ limpet tooth sample attached to the AFM into a second droplet of wet glue introduced to the AFM sample stage within the SEM chamber.

The glue was allowed to fully cure after 1 h in the SEM chamber to produce a tensile test configuration. The stress and strain of the sample was calculated using a fibre optic situated behind the AFM cantilever in order to determine the cantilever deflection during sample deformation.

Failure of limpet tooth was first evaluated using a macroscopic fragmentation test to establish the failure behaviour of the material and qualitatively justify failure of the reinforcing mineral phase in the tooth. Limpet teeth embedded within a solid epoxy resin were prepared for tensile testing.

Polished sample surface clearly exhibited the nanofibrous goethite as observed under backscattered electron imaging. Tensile testing of hydrated samples caused a progressive failure of the nanofibres, defined as a fragmentation of the nanofibres, resulting in a reduction in the average nanofibre length with



massimo teorico grazie all'incorporazione di nanofibre al di sotto della dimensione critica che definisce la tolleranza alle imperfezioni.

Campioni di Patella Vulgata raccolti a Southampton, UK, sono stati immediatamente risciacquati in acqua corrente in laboratorio e sacrificati durante la conservazione in frigorifero. La radula (appendice simile alla lingua) contenente le prime 5-10 file di denti ha mostrato evidenza di usura dovuta al grattare le superfici rocciose durante l'alimentazione. La parte restante della radula è stata tagliata in sezioni con lunghezze approssimate da 3 a 7 mm, ed è stata posta sulla base di alluminio di un microscopio elettronico usando un nastro di carbonio. La radula è stata lasciata asciugare sulla superficie del nastro di carbonio. Successivamente, sulla

base del dente è stata applicata della vernice d'argento per evitare l'accumulo di cariche durante l'osservazione elettronica. Piccoli campioni di denti sono stati preparati con tecniche FIB precedentemente utilizzate.

La prova di trazione è stata eseguita traslando l'estremità libera del provino “dog-bone” collegato al microscopio atomico AFM (Atomic Force Microscope) in una seconda goccia di colla liquida introdotta alla base del provino entro la camera SEM

(Scanning Electron Microscope). La colla è stata lasciata polimerizzare completamente dopo 1 h in camera SEM per produrre una configurazione di prova a trazione. La sollecitazione e deformazione del provino è stata calcolata utilizzando una fibra ottica situata dietro la mensola del microscopio atomico per determinarne la deflessione durante la deformazione del provino. Il cedimento strutturale è stato valutato utilizzando un test di frammentazione macroscopica per stabilire il comportamento del materiale e giustificare qualitativamente

il cedimento della fase minerale di rinforzo. Per la prova di trazione, sono stati preparati dei denti incorporati all'interno di una resina epossidica solida.

La superficie di un provino lucidato mostra chiaramente le nano fibre di goethite come osservato nelle immagini elettroniche.

Prove a trazione di provini idratati hanno causato un progressivo cedimento delle nanofibre, definito come la frammentazione delle nanofibre, con una conseguente riduzione della lunghezza media delle nanofibre con sforzo a trazione. La frammentazione della fase di rinforzo è definita, nella valutazione dei compositi, con la progressiva riduzione della lunghezza delle fibre di rinforzo fino ad un livello indicativo di “saturazione dello stress”.

Questa frammentazione della fase

minerale di rinforzo conferma quindi che il trasferimento di tensioni nel dente è sufficiente al cedimento delle nanofibre di goethite, contrariamente a un potenziale cedimento interfacciale e pull-out delle nanofibre comunemente riscontrata in materiali biologici resistenti. Così, il cedimento della fase minerale definisce il dente come materiale potenzialmente resistente. La valutazione del cedimento dei denti di patella è poi proseguita con le prove meccaniche di volumi discreti di materiale. Il provino è stato testato a trazione utilizzando l'AFM e osservando con il SEM. Il comportamento sforzo-deformazione dei campioni è stato registrato durante la prova di trazione fino alla rottura. Tutti i provini hanno mostrato un comportamento elastico lineare pronunciato fino alla rottura, con evidenza di non linearità, quando

lo strain ha superato il 2% circa. Si osserva variabilità nelle curve sforzo-deformazione, perché la distribuzione della fase di rinforzo all'interno del dente non è molto ordinata. Ad esempio, un modulo elastico superiore può essere previsto perché il volume testato conteneva una quantità relativamente grande di fase minerale rispetto ad altri campioni. La deformazione può essere spiegata considerando la corrispondente struttura testata. I denti di patella contengono una frazione elevata di volume di minerale e la risposta allo stress dovrebbe essere dominata dalle proprietà meccaniche del minerale di rinforzo. La matrice proteica morbida potenzialmente contribuisce al comportamento



applied tensile strain. Fragmentation of the reinforcing phase is established in composites evaluations, with the progressive reduction in reinforcing fibre lengths until a plateau region indicative of a stress 'saturation'. This fragmentation of the reinforcing mineral phase therefore confirms that stress transfer within the tooth material is sufficient to fail the goethite nanofibres, as opposed to potential

interfacial failure and pull-out of the nanofibrous phase commonly encountered in tough biological materials. Thus, the failure of mineral phase defines

the limpet tooth as a potentially strong material. Evaluating the failure of limpet teeth then progressed to mechanical testing of discrete material volumes. The dog-bone sample was tensile tested to failure using AFM while observing with SEM. The stress-strain behaviour of the limpet tooth samples was recorded during tensile testing until failure. All samples showed a pronounced linear elastic behaviour

until failure, with evidence of nonlinearity when the sample strain exceeded approx. 2%. Variability in the stress–strain curves is observed, because the distribution of the reinforcing phase within the limpet tooth is not particularly highly ordered. For example, a higher elastic modulus can be expected owing to the discrete volume tested containing a relatively large amount of mineral phase compared with other samples. The deformation of the tooth can be explained by consideration of the corresponding structure tested. Limpet teeth contain a high volume fraction of mineral phase, with the stress–strain response expected to be dominated by the mechanical properties of the reinforcing mineral. The softer protein matrix will potentially contribute to the nonlinear stress–strain behaviour, especially as the goethite phase present in the tooth has been shown to be linear elastic. However, the linear elastic modulus of the tensile tested limpet tooth samples taken from the plot is 120 ± 30 GPa, which is beyond an expected polymeric value and approaches elastic moduli values of around 180 GPa measured for the pure mineral phase.

Thus, the deformation behaviour of the limpet teeth is justified as being dominated by the mineral phase. The maximum tensile stress at failure of the limpet tooth samples, shows variability within the dataset. Variability in the strength of the limpet tooth material is defined by either the length of the sample tested, as described by evaluations of stress concentrations around flaws, or governed by flaw insensitivity of the mineral nanofibres. The strength of the

non lineare di stress, specialmente perché la goethite presente ha dimostrato di essere elastica lineare. Tuttavia, il modulo elastico lineare dei campioni testati a trazione è 120 ± 30 GPa, che è oltre l'atteso valore polimerico e si avvicina a valori dei moduli elastici di circa 180 GPa misurati per la fase minerale pura.

Così, il comportamento a deformazione del "dente" è dominato dalla fase minerale. Il carico di rottura dei campioni mostra variabilità all'interno del gruppo di dati. La variabilità nella resistenza del materiale è definita o dalla lunghezza del campione testato, come descritto da valutazioni delle concentrazioni di tensione intorno difetti, o è governata dalla mancanza di sensibilità delle nanofibre minerali.

Un grafico della resistenza a trazione dei campioni, mostra il variare della lunghezza del campione testato. La resistenza dei campioni, definita dalla fase minerale, è all'interno di un range di valori fra 3,0-6,5 GPa e conferma una volta di più che la resistenza alla trazione di un dente di patella è potenzialmente la più alta mai registrato in natura, superando la resistenza delle fibre di seta del ragno. Un fitting lineare dei dati sperimentali indica che la resistenza non dipende dalla dimensione.

Discussione

La resistenza alla trazione dei campioni e il corrispondente modulo elastico sono rispettivamente $4,90\pm 1,90$ e 120 ± 30 GPa. Le proprietà meccaniche dei campioni sono regolate dalla deformazione e rottura dei legami chimici all'interno delle nanofibre minerali di goethite, e quindi possono essere definiti per mezzo delle informazioni strutturali relative. Studi cristallografici sulla goethite sono stati effettuati sia teoricamente che sperimentalmente con deformazione e cedimento dovuti all'asse

limpet tooth samples, defined by the mineral phase, lies within a range from 3.0 to 6.5 GPa and again confirms that the tensile strength of a limpet tooth is potentially the highest ever recorded in nature, exceeding the strength of spider silk fibres. A simple mean line fitted through the experimental data indicates a lack of size-dependent strength.

Discussion

The tensile strength of limpet tooth samples and the corresponding elastic modulus taken from are 4.90 ± 1.90 and 120 ± 30 GPa, respectively. The mechanical properties of limpet tooth samples are governed by deformation and breaking of chemical bonds within the goethite mineral nanofibres, and therefore can be defined from structural information on goethite. Crystallographic studies of goethite have been carried out both theoretically and experimentally with deformation and failure owing to the external loading axis in tensile tests predominantly aligned with the long c-axis of the mineral crystal. This considerable strength of limpet teeth defined from the crystal structure of goethite is potentially outstanding.

Indeed, the mechanical strength of the limpet tooth is comparable to that of the strongest man-made fibres, e.g. high-performance Toray T1000G carbon fibres have a tensile strength of 6.5 GPa.

di carico di trazione prevalentemente allineato con l'asse c del cristallo minerale. Questa notevole resistenza dei "denti" delle patelle, determinata dalla struttura cristallina della goethite, è potenzialmente eccezionale. Infatti, la resistenza meccanica del dente è paragonabile a quello delle fibre artificiali più resistenti, ad esempio le fibre di carbonio Toray T1000G ad alte prestazioni hanno una resistenza alla trazione di 6,5 GPa.

Adapted by Simonetta Pegorari.
Fully published on Interface Journal of The Royal Society n. 12 - 20141326
Adattamento di Simonetta Pegorari.
L'articolo è stato pubblicato integralmente su Interface, The Royal Society n. 12 - 20141326

ABOUT THE ITALIAN AUTHOR

Prof. Nicola M. Pugno. Full Professor of Solid and Structural Mechanics at the University of Trento, Italy and there Founder and Head of the Laboratory of Bio-Inspired and Graphene Nanomechanics (previous Professor, Founder and Head of the Laboratory of Bio-Inspired Nanomechanics "Giuseppe Maria Pugno", at the Politecnico di Torino, Italy). He is also the Scientific Responsible of Graphene Nanocomposites (within the Graphene Flagship) at the Fondazione Bruno Kessler, Trento, Italy and Full Professor of Materials Science at the Queen Mary University of London, London, UK as well as member of the Scientific and Technical Committee of the Italian Space Agency.

Prof. Pugno has received the 2011 ERC Starting Grant and in 2013 both the two ERC Proof of Concept assigned to Italy by the European Research Council.

Prof. Nicola M. Pugno. Professore Ordinario di Scienza delle Costruzioni presso l'Università di Trento e fondatore e Direttore del Laboratorio di Bio-Inspired and Graphene Nanomechanics (precedentemente Professore, Fondatore e Direttore del Laboratorio di Bio-Inspired Nanomechanics "Giuseppe Maria Pugno", presso il Politecnico di Torino). Responsabile scientifico del Graphene Nanocomposites (all'interno del Graphene Flagship) presso la Fondazione Bruno Kessler, Trento e Professore Ordinario di Scienza dei Materiali presso la Queen Mary University of London, UK e membro del Comitato tecnico e scientifico dell'Agenzia Spaziale Italiana.

Il Prof. Pugno ha ricevuto l'ERC Starting Grant 2011 e nel 2013 entrambi gli ERC Proof of Concept assegnati all'Italia dall'Consiglio Europeo della Ricerca.