

**PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE ESPECÍMENES FÓSILES POR
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ESPECTROSCOPIA DE
ENERGÍA DISPERSIVA**

RAY SEBASTIÁN MANTILLA ANGARITA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE GEOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2018

**PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE ESPECÍMENES FÓSILES POR
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ESPECTROSCOPIA DE
ENERGÍA DISPERSIVA**

RAY SEBASTIÁN MANTILLA ANGARITA

**Proyecto de grado en Modalidad de Investigación para optar al título de
Geólogo**

Director:

CARLOS ALBERTO RÍOS REYES

Geólogo PHD.

Codirector:

JAVIER HERNANDO JEREZ JAIMES

Biólogo M. SC.

Codirector:

RICARDO AMOROCHO PARRA

Geólogo M. SC.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE GEOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2018

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial al PhD. Carlos Alberto Ríos Reyes, director del proyecto, por su apoyo total y decidido en el planteamiento y ejecución de esta investigación; igualmente a los codirectores M. Sc. Javier Hernando Jerez Jaimes por su disposición de guiar y aportar conocimiento en este proyecto y M. Sc. Ricardo Amorocho Parra por sus aportes de conocimientos requeridos en el trabajo.

Al Grupo de Investigación en Geología Básica Aplicada, GIGBA, de la Universidad Industrial de Santander por apoyar y facilitar el desarrollo de este proyecto.

Al Laboratorio de Microscopía de la Universidad Industrial de Santander – Parque Tecnológico de Guatiguará, su responsable y profesionales analistas, Carolina Mendoza y Carlos Chacón, por su soporte técnico y asistencia en la adquisición de datos.

A la universidad Industrial de Santander, la Escuela de Geología y toda su planta de profesores en la contribución a mi desarrollo como profesional.

DEDICATORIA

Este proyecto se lo dedico a mis padres Raimundo Mantilla y Nelly Angarita, por haberme educado, brindarme amor, consejos y apoyarme todos estos años para poder llegar a este nivel académico, a ellos porque siempre estuvieron ahí para guiarme y ayudarme en todo lo que necesite durante todos mis años de formación.

A mis amigos Lee, Sebastián y Jorge por acompañarme durante todo este arduo camino en el cual compartimos alegrías y fracasos.

A los dioses, a la vida y al destino por permitirme llegar a cumplir una de mis metas y sueños que es ser un profesional en Geología.

A todos los profesores, compañeros y personas que han formado parte de mi vida porque también han aportado un granito de arena en este largo camino hasta el título universitario.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
2. OBJETIVO GENERAL	18
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. ANTECEDENTES.....	19
3.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES	19
3.2 ANTECEDENTES NACIONALES.....	21
4. GENERALIDADES	24
4.1 MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (MEB).....	24
4.2 BAJO VACÍO.	26
4.3 MAPEO ELEMENTAL.....	26
4.4 TIPOS DE MUESTRAS ANALIZADAS	27
5. METODOLOGÍA	28
5.1 RECOPIACIÓN BIBLIOGRÁFICA	29
5.2 SELECCIÓN DE MUESTRAS	29
5.3 ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	31
5.3.1 Análisis de los Resultados	35
5.3.2 Análisis de Mapeo Elemental.....	35
5.3.3 Establecimiento de un Protocolo.....	37
6. RESULTADOS.....	39
6.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO CON RECUBRIMIENTO.....	39
6.1.1 Ejemplo Práctico 1: Análisis del ojo del <i>Viaphacops cristata</i> (Trilobita).	40
6.2 ANÁLISIS EDS CON RECUBRIMIENTO.....	41

6.2.1 Ejemplo Práctico 2: Variación composicional de <i>Colombianaspis carvalhoe</i> (Trilobita).....	42
6.2.2 Ejemplo Práctico 3: Variación composicional del Braquiópodo B30	46
6.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO SIN RECUBRIMIENTO.....	58
6.3.1 Ejemplo Práctico 5: Análisis Morfológico del Foraminífero <i>Orthokarstenia ewaldi</i>	59
6.4 ANÁLISIS EDS PARA MUESTRAS SIN RECUBRIMIENTO.....	60
6.4.1 Ejemplo Práctico 6: Composición química de la conchilla y el relleno de un Bivalvo de la formación Rosablanca del cretácico inferior	60
6.4.2 Ejemplo Práctico 7: Meteorización en un Braquiópodo de la formación floresta	65
6.5 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS Y EDS DE MUESTRAS ÓSEAS.	68
6.5.1 Ejemplo Práctico 8: Diente de Pliosauridae	69
6.5.2 Ejemplo Práctico 9: Diente de Plesiosauridae	74
6.5.3 Ejemplo Práctico 10: Diente de Pez Picnodontidae	79
6.6 ANÁLISIS DE MAPEO ELEMENTAL.....	83
6.6.1 Ejemplo Práctico 11: Mapeo Elemental de un zoario del Briozoo <i>Fenestella harrisi</i> del Devónico temprano	84
7. PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE ESPECÍMENES FÓSILES POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	87
7.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	87
7.2 ANÁLISIS EN EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.....	87
7.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	88
8. DISCUSION	89
9. CONCLUSIONES	91
BIBLIOGRAFÍA	93

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Sistema Esquemático que muestra el funcionamiento del Sistema SEM/EDX.....	25
Figura 2. Diagrama del proceso de Investigación.....	28
Figura 3. Maquina Evaporadora Quórum Q150R usada para el recubrimiento de las muestras.....	32
Figura 4. Muestras de dientes fósiles montadas dentro del Microscopio Electrónico de Barrido antes de ser analizadas.....	33
Figura 5. Imagen de electrones secundarios (SE) mostrando los principales rasgos morfológicos del Genero <i>Fenestella harrisi</i>	34
Figura 6. Análisis EDS, para una concha de Braquiópodo del Devónico. Nótese el espectro característico de este material y la silicificación del mismo.....	35
Figura 7. Segmento de una colonia del briozoo <i>Fenestella harrisi</i> que se analizó mediante el mapeo elemental.....	36
Figura 8. Análisis que se puede realizar con el Microscopio Electrónico de Barrido de la UIS.....	38
Figura 9. Imagen de electrones secundarios (SE) mostrando los principales rasgos morfológicos del ojo y las lentes esféricas del Trilobite <i>Viaphacops cristata</i> de la Formación Floresta (Macizo de Floresta).	41
Figura 10. <i>Colombianaspis carvalhoe</i> (Trilobita) analizado en el Microscopio Electrónico de Barrido, mediante la técnica de Alto Vacío. A. Imagen en Muestra de Mano del Trilobite. B. Imagen de electrones retrodispersados a magnificación de 80x.....	43
Figura 11. Imagen de Electrones Retrodispersados de la región del Trilobite con los puntos analizados mediante la técnica EDS.	44

Figura 12. Espectro elemental de la región A del fósil <i>Colombianaspis carvalhoe</i>	45
Figura 13. Espectro elemental de la región B del fósil <i>Colombianaspis carvalhoe</i>	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14. Espectro elemental de la región C del fósil <i>Colombianaspis carvalhoe</i>	¡Error! Marcador no definido.
Figura 15. Regiones analizadas con electrones retrodispersados en las cuales se realizaron los análisis EDS, a la izquierda la región 1 y región 2.....	46
Figura 16. Electrones retrodispersados a 100x del Braquiópodo B30 en la región 1 con los puntos escogidos para el análisis EDS.....	47
Figura 17. Espectro composicional de la región 1 sección A.....	48
Figura 18. Espectro composicional de la región 1 sección B... definido.	¡Error! Marcador no
Figura 19. Imagen de electrones retrodispersados a 100x del Braquiópodo B30 con los puntos escogidos para el análisis EDS de la Región 2.....	49
Figura 20. Espectro composicional de la región 2 sección C.....	50
Figura 21. Espectro composicional de la región 2 sección D... definido.	¡Error! Marcador no
Figura 22. Muestras de Briozoo <i>Fenestella harrisi</i> analizadas. A. Muestra M-16 procedente del yacimiento Monticelo en la base de la Formación Floresta. B. Muestra Fen13 recolectada metros más arriba en la columna de la Formación Floresta.....	51
Figura 23. Imágenes en electrones retrodispersados de la muestra M-16. A. Imagen a 100x. B. Imagen a 250x.	52
Figura 24. Imagen de electrones retrodispersados a 400x de la muestra de <i>Fenestella harrisi</i> M-16 con los puntos seleccionados para el análisis EDS.....	53
Figura 25. Espectro composicional de la <i>Fenestella harrisi</i> en el punto A.....	54
Figura 26 Espectro composicional de la <i>Fenestella harrisi</i> en el punto B. definido.	¡Error!

Figura 27. Espectro composicional de la *Fenestella harrisi* en el punto C.....¡Error!

Marcador no definido.

Figura 28. Imágenes obtenidas en el Microscopio Electrónico de Barrido de *Fenestella harrisi* Fen13. A. Imagen en electrones retrodispersados a 100x. B. Imagen de electrones secundarios a 100x. C. Imagen de electrones retrodispersados a 300x. D. imagen de electrones retrodispersados a 1200x en la que se realiza el análisis EDS.....55

Figura 29. Imagen de electrones retrodispersados de *Fenestella harrisi* Fen13 a 1200x con los puntos de análisis EDS.....56

Figura 30. Espectro composicional de la *Fenestella harrisi* en el punto A.....57

Figura 31. Espectro composicional de la *Fenestella harrisi* en el punto B.....¡Error!

Marcador no definido.

Figura 32. Imágenes de Electrones Secundarios del Foraminífero *Orthokarstenia ewaldi*. A. Imagen a 100x. B. Imagen a 400x.....59

Figura 33. Imágenes de Electrones Retrodispersados del Bivalvo. A. Imagen de electrones retrodispersados de la cubierta de Hierro a 5000x. B. Imagen de electrones retrodispersados del relleno de sílice del bivalvo a 10000x.....61

Figura 34. Imagen de electrones retrodispersados de la cubierta de Hierro del Bivalvo con su respectivo punto donde se realizó el análisis EDS.62

Figura 35. Espectro composicional de la cubierta de hierro del Bivalvo.62

Figura 36. Imagen de electrones retrodispersados del relleno interno silíceo del Bivalvo, junto con los puntos que recibieron el análisis EDS.....63

Figura 37. Espectro composicional del relleno del bivalvo en la región A.....64

Figura 38. Espectro composicional del relleno del bivalvo en la región B.....¡Error!

Marcador no definido.

Figura 39. Braquiópodo en muestra de mano.....65

Figura 40. Análisis EDS de la muestra de Braquiópodo. A. Imagen del montaje y punto a donde se realiza la toma de las imágenes de electrones retrodispersados. B. Imagen de electrones retrodispersados en la que se realiza el análisis EDS 1.

C. Imagen de electrones retrodispersados en la que se realiza el análisis EDS 2.	
D. Imagen de electrones retrodispersados en la que se realiza el análisis EDS 3.	66
Figura 41. Espectro composicional del braquiópodo en la región 1.....	67
Figura 42. Espectro composicional del braquiópodo en la región 2.....	67
Figura 43. Espectro composicional del braquiópodo en la región 3.....	68
Figura 44. Imágenes de electrones Secundarios del Diente del Pliosauridae. A. Posición del punto analizado en el Microscopio Electrónico de Barrido. B. Imagen de Electrones Secundarios del punto a 40X. C. Imagen de Electrones Secundarios a 80X. D. Imagen de Electrones secundarios a 300x.	70
Figura 45. Imágenes tomadas para el análisis EDS del diente de Pliosauridae. A. Punto tomado del Diente para el análisis EDS. B. Imagen de Electrones Secundarios a 80x. C. Imagen de Electrones Retrodispersados a 5000X. D. Imagen de electrones retrodispersados usada para el análisis EDS a 10000x.	71
Figura 46. Puntos Analizados con la técnica EDS del diente de Pliosauridae.....	72
Figura 47. Espectro composicional del diente de Pliosauridae en la Región A.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 48. Espectro composicional del diente de Pliosauridae en la Región B.	73
Figura 49. Imágenes de electrones Secundarios del Diente de Plesiosauridae. A. Posición del punto analizado en el Microscopio Electrónico de Barrido. B. Imagen en electrones retrodispersados a 40x. C. Imagen en electrones Secundarios a 80X. D. Imagen de electrones secundarios a 200x.....	75
Figura 50. Imágenes de Electrones Retrodispersados del diente de Plesiosauridae usados para el análisis EDS. A. Imagen de Electrones Retrodispersados a 80x. B. Imagen de Electrones Retrodispersados a 300x con la cual se realizó el análisis EDS.	76
Figura 51. Puntos Analizados con la técnica EDS del diente de Plesiosauridae...	77
Figura 52. Espectro composicional del diente de Plesiosauridae en el punto A. ...	78
Figura 53. Espectro composicional del diente de Plesiosauridae en el punto B.	¡Error! Marcador no definido.

Figura 54. Imágenes en diferentes magnificaciones de electrones secundarios del Diente del Pez Picnodontidae. A. Imagen en SE a 200x. B. Imagen en SE a 500x. C. Imagen en SE a 2000x. D. Imagen en SE a 12500x.	80
Figura 55. Ubicación de los puntos EDS tomados del diente del pez Picnodontidae.	81
Figura 56. Imagen en electrones Retrodispersados con los puntos EDS analizados del diente del pez Picnodontidae. A. Imagen en electrones retrodispersados a 3000x. B. Imagen en electrones retrodispersados a 6000x.	81
Figura 57. Espectro composicional del diente en la región A.	82
Figura 58. Espectro composicional del diente en la región B.	82
Figura 59. Mapeo elemental del Briozoo <i>Fenestella harrisi</i> . A. Muestra de Mano. B. Primer análisis de mapeo mediante una imagen de electrones secundarios. C. Imagen de electrones retrodispersados usada en el Mapeo Elemental. D. Imagen de electrones Secundarios del segmento analizado.	85
Figura 60. Mapas texturales de <i>Fenestella harrisi</i> para cada elemento analizado.	86

RESUMEN

TITULO: PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE ESPECÍMENES FÓSILES POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ESPECTROSCOPIA DE ENERGÍA DISPERSIVA *

AUTOR: RAY SEBASTIÁN MANTILLA ANGARITA**

PALABRAS CLAVES: PALEONTOLOGÍA, SEM, EDS, EDX

DESCRIPCIÓN

Mediante el microscopio electrónico de barrido de la Universidad Industrial de Santander se realizó una serie de experimentos con muestras fósiles, las cuales se pueden clasificar como fósiles permineralizados, autigénicos y duripátricos. Se analizaron fósiles pertenecientes a los grupos taxonomicos animales Trilobita, Bryozoa, Braquiópoda, Bivalva, Foraminífera y Vertebrata.

Durante el desarrollo de la experimentación se utilizaron las distintas técnicas de análisis que posee el microscopio electrónico de barrido. El primer método de análisis fue el registro de imágenes en electrones secundarios (SE), con el objetivo de realizar estudios morfológicos mediante el análisis detallado de sus partes en magnificaciones altas. El segundo método de estudio fue el registro de imágenes en electrones retrodispersados (EDX), con la intención de realizar análisis composicionales EDS, permitiendo conocer la composición química de la muestra. La tercera herramienta usada en el desarrollo del trabajo fue el mapeo elemental, el cual permite conocer la composición química de la muestra mediante una serie de mapa texturales.

Debido a que las características de las muestras pueden influir en el resultado del análisis, con este tipo de microscopia, se debe realizar una preparación diferente y adecuar debidamente las condiciones ambientales de la cámara del microscopio. Con el propósito de la comprensión de cada método, se desarrollaron experimentos mediante ejercicios basados en preguntas que se pueden resolver usando este equipo. Los ejemplos consisten en las diferentes combinaciones entre las técnicas de preparación de las muestras y las condiciones ambientales del microscopio electrónico de barrido.

Durante la experimentación se reconocieron algunas dificultades para realizar los análisis por lo tanto se plantea un protocolo estándar para el análisis de muestras fósiles en el microscopio electrónico de barrido, que simplifica la toma de decisiones en el momento de solicitar este tipo de estudio.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingeniería Físico – Químicas. Escuela Geología. Director. PhD. Carlos Alberto Ríos Reyes. Codirectores. M. Sc. Javier Hernando Jerez Jaimes y M. Sc Ricardo Amoroch Parra.

ABSTRACT

TITLE: PROTOCOL FOR THE ANALYSIS OF FOSSIL SPECIMENS BY SCANNING ELECTRONIC MICROSCOPE AND DISPERSIVE ENERGY SPECTROSCOP *

AUTHOR: RAY SEBASTIAN MANTILLA ANGARITA**

KEYWORDS: PALEONTOLOGY, SEM, EDS, EDX.

DESCRIPTION

Through the scanning electron microscope of the Universidad Industrial de Santander (UIS), several series of experiments was carried out with fossil samples, which can be classified as permineralized, authigenic and duripatric fossils. Fossils belonging to taxonomic groups Trilobita, Bryozoa, Brachiopoda, Bivalva, Foraminifera and Vertebrata were analyzed.

In the development of the experiment, the different scanning techniques of the scanning electron microscope were used. The first analysis method was the recording of images in secondary electrons (SE), with the objective of carrying out morphological studies by means of the detailed analysis of their parts in high magnifications. The second method was the recording of images in backscattered electrons (EDX), with the intention of making compositional analysis EDS, allowing to know the chemical composition of the sample. The third technique was the elementary mapping, which allows to know the chemical composition of the sample by means of a series of textural maps.

Due the characteristics of the samples can influence the result of the analysis in this type of microscopy, a different preparation must be carried out and the environmental conditions of the microscope chamber must be adequately adapted. For the purpose of understanding each study, experiments were developed using examples based on questions that can be solved using this equipment. The examples consist of the different combinations between the techniques of preparation of the samples and the environmental conditions of the scanning electron microscope.

During the experimentation some difficulties were recognized to carry out the analyzes therefore a standard protocol for the analysis of fossil samples in the scanning electron microscope is proposed, which simplifies the decision at the moment of requesting this type of study.

* Degree Work

** Faculty of Physic-Chemical Engineering. School of Geology. Director. PhD. Carlos Alberto Ríos Reyes. Codirectores. M. Sc. Javier Hernando Jerez Jaimes y M. Sc Ricardo Amoroch Parra.

INTRODUCCIÓN

El microscopio electrónico de barrido (MEB) es una herramienta que permite análisis detallados sobre la morfología y composición de los materiales orgánicos e inorgánicos. El MEB es uno de los instrumentos más versátiles disponibles para la examinación y análisis de características microestructurales de un objeto sólido. El MEB es una herramienta importante debido a la apariencia tridimensional de las imágenes del espécimen.¹ Debido al tamaño pequeño de las aperturas y la longitud de onda de los electrones tan corta, se puede conseguir una gran profundidad de campo (por lo tanto más información de la muestra) comparado con la imagen que se obtendría con un microscopio óptico si se usa el mismo aumento.²

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento creador de imágenes que la hacen una herramienta invaluable en las ramas de la geología, tales como: sedimentología, información en imágenes tridimensionales de granos individuales, el intercrecimiento de los granos, datos sobre la fábrica y la porosidad de la muestra. Mineralogía, en el estudio de la morfología de los cristales en micro escalas. Petrología, por su capacidad de producir imágenes en secciones pulidas mostrando diferencias en los numero atómicos, es una técnica muy útil tanto para petrología sedimentaria como ígnea. En paleontología, el MEB es idealmente adecuado en el estudio de la morfología y composición de los fósiles especialmente para micro fósiles.³

¹ GOLDSTEIN J., NEWBURY D., ECHLIN P., JOY D. 1992. Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. Segunda Edición.

² NIETO, M. "Fundamentos en la preparación de muestras para microscopia electrónica de barrido." [En Línea]. 2010.

³ REED, J. 2005. Electron Microprobe Analysis and Scanning Electron Microscopy in Geology. Segunda Edición.

No hay duda que los minerales pueden ser identificados rápida y económicamente usando herramientas tradicionales de luz polarizada y microscopía óptica, no obstante estos métodos requieren secciones delgadas, un microscopio petrográfico y habilidades en mineralogía óptica, ahora bien el microscopio electrónico de barrido permite la identificación rápida usando la espectroscopía de energía dispersiva⁴, la cual no requiere de una gran destrucción del material para su estudio, permitiendo conservar la muestra analizada en las condiciones que fue recolectada.

Los paleontólogos intentan obtener el máximo conocimiento de los fósiles que estudian, por lo tanto cada vez es más importante tener acceso a las estructuras internas de las muestras. Numerosos estudios se han realizado utilizando métodos destructivos imposibilitando posibles futuros estudios, debido a esto se ha optado por el uso del Microscopio Electrónico de Barrido⁵.

Las técnicas del microscopio electrónico de barrido permiten análisis detallados en altas resolución de los especímenes, como fósiles vertebrados e invertebrados, durante el desarrollo de la investigación se encontraron dificultades en la interpretación de los diferentes análisis debido a que algunos resultados obtenidos no presentaban alta calidad en las imágenes debido a la metodología empleada para su estudio. En la literatura nacional se encontró que las técnicas de análisis pertenecientes al microscopio electrónico de barrido, son poco aplicadas para muestras fósiles. Por tal motivo se propone diseñar e implementar un protocolo para la caracterización de especímenes fósiles a partir del análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de energía dispersiva (EDX),

⁴ SEVERIN, K., "Energy Dispersive Spectrometry of Common Rocks Forming Minerals" Department of Geology and Geophysics, University of Alaska Fairbanks, U.S.A, 2004

⁵ TAFFOREAU, P., BOISTEL, R., BOLLER, E., BRAVIN, A. "Applications of X-ray synchrotron microtomography for non-destructive 3D studies of paleontological specimen". 2006.

esperando suscitar los cimientos de futuros análisis paleontológicos mediante el uso de esta herramienta.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El microscopio electrónico de Barrido es un instrumento que permite realizar análisis no destructivos de diferentes tipos de materiales orgánicos e inorgánicos. La interpretación de los fósiles constituye una herramienta muy importante para solucionar problemas estratigráficos, cronológicos, ambientales, evolutivos e inclusive diagenéticos. La microscopía electrónica de barrido ha sido muy utilizada para obtener información de la estructura tridimensional de los fósiles principalmente para resolver problemas taxonómicos. Otras aplicaciones para el uso del SEM en el marco nacional son muy poco conocidas o utilizadas. En consecuencia, se hace necesario el diseño de un protocolo estándar que permita conocer los tipos de análisis, sus modos de uso y la interpretación de los resultados para el uso del Microscopio Electrónico de Barrido del Laboratorio de Microscopía de la Universidad Industrial de Santander aplicado a la solución de problemas relacionados con fósiles.

2. OBJETIVO GENERAL

Diseñar e implementar un protocolo para la caracterización de especímenes fósiles a partir del análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de energía dispersiva (EDX).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El cumplimiento del objetivo general del trabajo de grado comprende:

- Establecer los parámetros que influyen en la preparación y el análisis SEM-EDS de acuerdo a la naturaleza del material.
- Establecer los parámetros que determinan el análisis SEM-EDS, en condiciones de alto y bajo vacío.
- Realizar análisis composicionales EDS con el fin de entender la fosilización y preservación de los especímenes.
- Realizar una comparación de los resultados obtenidos de los modos de operación del equipo, en condiciones de alto vacío y de bajo vacío.

3. ANTECEDENTES

3.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

El Burgess Shale es reconocido universalmente por su importancia en el conocimiento evolutivo, sin embargo, hay un desacuerdo en los modos de preservación de los fósiles después de su enterramiento. La técnica de mapeo elemental demostró las abundancias relativas de los elementos varía entre las diferentes características anatómicas de los especímenes. Estas diferencias reflejan las composiciones de los minerales que replican el organismo en descomposición, que se controla por los contrastes en la química del tejido. Los detalles morfológicos delicados se replican en los mapas elementales, mostrando que la mineralización autogénica era fundamental para preservar estos fósiles, a pesar de que algunos restos orgánicos también están presentes.⁶

En el estudio de la Micro estratigrafía y bioestratinomía de trilobites y ambiente de depositación del sector Ruin Wash lagerstätte de la Formación Pioche, en el estado de Nevada del periodo “Cámbrico Temprano”. La interpretación del ambiente del sector Ruin Wash el cual presenta una gran cantidad de trilobites del cámbrico en un estado de buena preservación. El análisis con el microscopio electrónico de barrido (MEB) en condiciones de alto vacío encontró que los trilobites habían sido reemplazados en calcita, clorita y algunos en sílice y embebidos en un halo de calcita por precipitación. Estos resultados demuestran que la preservación de los trilobites articulados se favorece cerca del límite distal del lavado asociado con los eventos de depósito, donde se produce una rápida sedimentación en la ausencia de reelaboración sustrato y la sobreimpresión

⁶ ORR, P., BRIGGS, D., KEARNS, S., “Cambrian Burgess Shale Animals Replicated in Clay Minerals,” Science: Vol. 281, Issue 5380, pp. 1173-1175, 21 Aug 1998.

tafonomía diferencial en la conservación de trilobites puede ocurrir dentro de una sucesión monofacial, impulsada por un cambio ambiental sutil insuficiente para dejar una firma litológica distinta. Esto resalta la necesidad de un cuidadoso análisis microstratigráfico, sedimentológico e icnológico previo a la comparación de los parámetros paleobiológicos o paleoecológicos inferidos a partir de conjuntos fósiles, incluso cuando los ensamblajes ocurren dentro de las mismas litofacies.⁷

Los procesos de curación con los fósiles pueden considerarse agentes tafonómicos en las colecciones de museos. Las modificaciones pueden ocurrir durante la preparación, lo que afecta la integridad de los tejidos y esqueletos óseos o su composición molecular y geoquímica. Los autores utilizaron un microscopio electrónico de barrido (SEM) empleando el alto vacío sin una película de recubrimiento para analizar los métodos estándares de preparación de muestras fósiles. El objetivo de este documento fue evaluar los métodos de preparación para determinar aquellos que proporcionan las mejores observaciones SEM y las que mejor conservan los tejidos óseos y menos dañan las superficies fósiles. El estudio de estas alteraciones, proporciona criterios que ayudan a reconocer las modificaciones que pueden ocurrir en la naturaleza, según los resultados se deben evitar los consolidantes disueltos en acetona y prevenir el contacto con encimas con los fósiles por tiempo prolongado, debido a que afectan los componentes del fósil y disminuyen considerablemente la calidad de los análisis en el SEM.⁸

En el estudio de microfósiles de tamaño micrométrico, abundantes en capas enriquecidas con sulfuro de Ni-Mo se utilizó la microscopía electrónica de barrido encontrando que los microfósiles incluyen vesículas con estructuras de paredes

⁷ WEBSTER, M., GAINES, R., HUGHES, N., “Microstratigraphy, trilobite biostratigraphy, and depositional environment of the “Lower Cambrian” Ruin Wash Lagerstätte, Pioche Formation, Nevada”. 2008. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 264 (2008) 100–122.

⁸ FERNANDEZ, Y., MARÍN, M., “Experimental taphonomy in museums: Preparation protocols for skeletons and fossil vertebrates under the scanning electron microscopy”. 2008.

orgánicas transparentes y contenidos internos permineralizados. Estas estructuras se parecen a las algas verdes unicelulares. Los resultados de análisis EDS revelaron que ambos metales de transición adsorbidos a la biomasa y los metales de proteínas estructurales biológicas podrían acumularse y mineralizarse de las algas, seguidos de la reducción e inmovilización microbiana anóxica.⁹

Se describe un conjunto excepcionalmente bien conservado de numerosos fósiles trazas tanto invertebrados como vertebrados del Devónico inferior de las montañas de Holy Cross, en el sur de Polonia. Dos horizontes con trazas se producen en la secuencia somera-marina que está expuesta en un pequeño afloramiento cerca de la aldea de Ujazd, estas trazas fueron analizadas mediante métodos de microscopía electrónica de Barrido, en las cuales se realizaron tomas de imágenes en electrones secundarios para análisis morfológicos, estos proporcionaron la primera evidencia directa para el comportamiento de alimentación del pez del Devónico, así como el primer registro de tejido blando tridimensional del área del hocico de un representante de Emisiano de este grupo. Los restos de fósiles de Ujazd proporcionan una nueva perspectiva de la paleoecología y la tafonomía del Devónico Inferior de las Montañas de la Santa Cruz.¹⁰

3.2 ANTECEDENTES NACIONALES.

El análisis micropaleontológico y petrográfico de los niveles calcáreos de la Formación Paja (Boyacá-Santander, Colombia) muestra características muy

⁹ XU, J., LI, Y. An SEM study of microfossils in the black shale of the Lower Cambrian Niutitang Formation, Southwest China: Implications for the polymetallic sulfide mineralization”, 2014. *Ore Geology Reviews* 65 (2015) 811–820

¹⁰ SZREK P., SALWA S. y NIDWIEDZK G., “A glimpse of a fish face — An exceptional fish feeding trace fossil from the Lower Devonian of the Holy Cross Mountains, Poland”. 2016. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 454 (2016) 113–124.

similares y la presencia homogénea de la asociación fósil encontrada hace que se consideren estos niveles calcáreos como un "bioevento" con posible relevancia estratigráfica dentro de la Formación Paja, se usaron imágenes de electrones secundarios tomadas en condiciones de bajo vacío sin recubrimiento. En estudios morfológicos de los foraminíferos con el Microscopio electrónico de Barrido en condiciones de alto vacío y recubiertas.¹¹

Se reportó por primera vez el género *Stomatopora* Bronn 1825 (*Bryozoa: Cyclostomata*) en la Formación Rosa Blanca del Cretácico inferior de Colombia. El material estudiado corresponde con dos conchas del braquiópodo *Sellithyris* sella sobre las cuales se encontraron las colonias de *Stomatopora*. Se utilizó el microscopio electrónico de barrido en condiciones de alto vacío y sin recubrimiento con el objetivo de reconocer rasgos morfológicos tales como ramificaciones y aberturas de los ósculos permitiendo determinar el registro para la especie en Colombia.¹²

Mediante la toma de imágenes de electrones secundarios se estudió la estructura de un diente fósil del tiburón *Serratolamna serrata* (Agassiz) (Pisces: Neoselachii) del Maastrichtiano (Cretácico Tardío) en Colombia, mientras que con los análisis de composición EDS se determinó la composición del mismo espécimen.¹³

El estudio de los trilobites y los braquiópodos inarticulados devónicos colombianos permitieron reconocer dos niveles bioestratigráficos dentro de la Formación Floresta, a través del microscopio electrónico de barrido, mediante la toma de

¹¹ PATARROYO-CAMARGO, German David; PATARROYO, Pedro; SÁNCHEZ-QUIÑÓNEZ, Carlos Alberto. 2009. Foraminíferos bentónicos en el Barremiano inferior de la Formación Paja (Boyacá-Santander, Colombia): Evidencias preliminares de un posible bioevento. *Geología Colombiana*, 34:111-122.

¹² JEREZ-JAIMES, J.H., CETINA-TARAZONA, M.A., y ARAQUE-GÓMEZ, C. N. 2013. Primer Registro del Briozoo *Stomatopora* aff. *cunningtoni* (Orden: Cyclostomata, Familia. Stomatoporidae) en el Cretácico Inferior de Colombia. *Boletín de Geología*, 35(2): 45-51. Mc Graw, H. "Principios de Análisis Instrumental", Madrid, 2002.

¹³ JEREZ-JAIMES, J.H., CRUZ-GUEVARA, L.E., PINZÓN-GÓMEZ, R., y PORRAS-MONTERO, J.R. 2014. Primer Registro de *Serratolamna serrata* (Agassiz) (Pisces

imágenes de electrones secundarios en condiciones de alto vacío se estudió la morfología de las especies clasificándolas taxonómicamente con el fin de definir dos niveles bioestratigraficos dentro de la formación floresta. En el primer nivel de la base de la formación (Emisiano) determinaron la ocurrencia de 14 taxa de trilobites y en el segundo nivel (Givetiano) con dos taxa de trilobites. El trabajo aporta conocimiento detallado en cuanto a clasificación taxonómica de las diferentes especies de trilobites y braquiópodos de la formación Floresta.¹⁴

¹⁴ MORZADEC, P., MERCH, M., VILLARROEL, C., JANVIER, P., RACHEBOEUF, P., “Trilobites and inarticulate brachiopods from the Devonian Floresta of Formation Floresta: a review,” *Bulletin of Geosciences* 90(2), 331–358, Marzo 23, 2015.

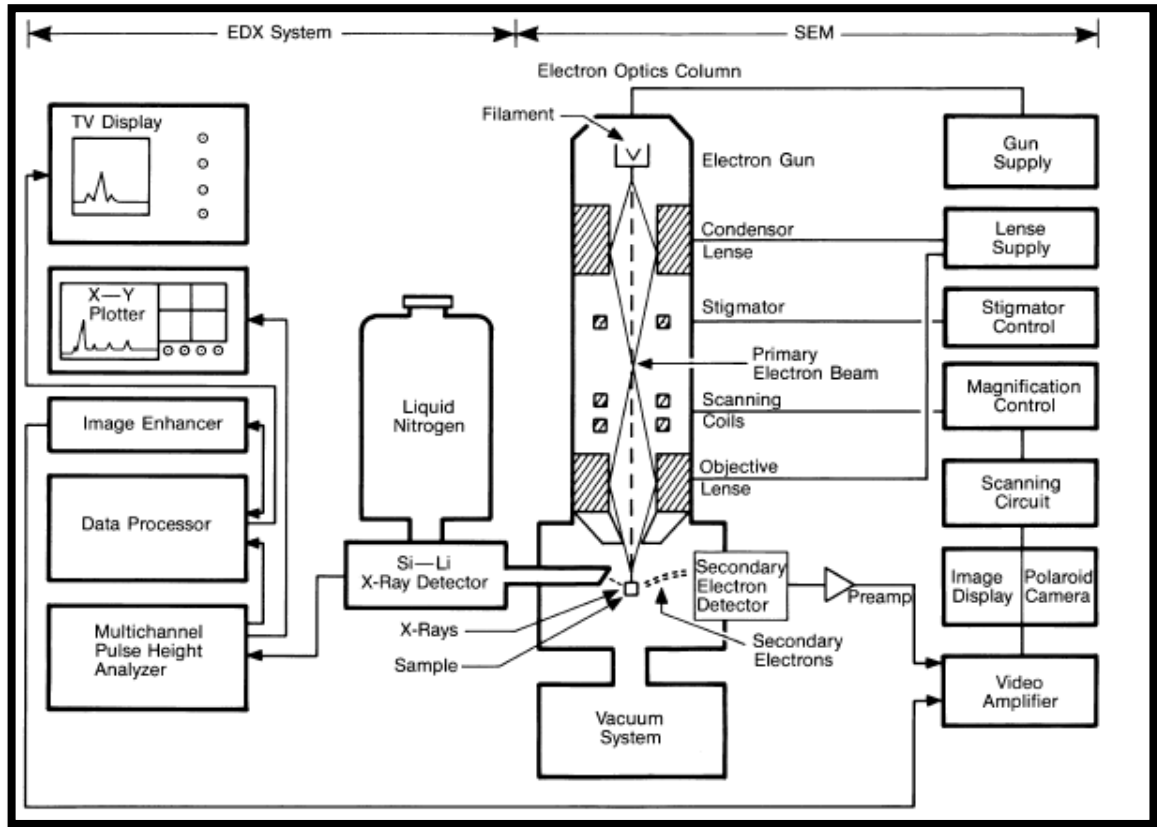
4. GENERALIDADES

4.1 MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (MEB).

El microscopio electrónico de barrido (MEB) o en inglés Scanning Electron Microscope (SEM), es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. En el microscopio electrónico de barrido (MEB), el haz electrónico, atraviesa la columna y llega a la muestra. Un generador de barrido es el responsable de producir el movimiento del haz, de manera que barra la muestra punto a punto (Figura 1). De la interacción entre los electrones incidentes con los átomos que componen la muestra se generan señales, las cuales pueden ser captadas con detectores específicos para cada una de ellas. El detector capta una señal y las convierte en una señal electrónica que es proyectada en una pantalla (CRT).¹⁵

¹⁵ SORRIVAS, V., YAÑEZ, M., ALFONSINA MORALES, “Principios y Practica de la Microscopio Electrónica”, 2014.

Figura 1. Sistema Esquemático que muestra el funcionamiento del Sistema SEM/EDX



Fuente: Tomado de Welton (2015)

El MEB es inigualable en el estudio de minerales arcillosos porque permite una gran magnitud de vista tridimensional de la superficie de la arcilla sin modificar, con una gran profundidad de enfoque. La única preparación para la muestra es un recubrimiento delgado metálico, aplicado en una cámara de vacío evaporador, la cual sirve para prevenir la acumulación de electrones sobre la superficie por la conductividad estática. Con el microscopio convencional de transmisión de electrones (TEM), las partículas superficiales de las arcillas no pueden ser observadas directamente ¹⁶

¹⁶ BOHOR, B., HUGHES, R., "Scanning Electron Microscopy of clay and clay minerals". 1970.

4.2 BAJO VACÍO.

La técnica de bajo vacío se genera a partir de un rayo de electrones permitiendo la examinación de una muestra. El instrumento es equipado con un detector de Rayos-X EDS (Energy Dispersive Spectrometer) y un detector Backscatter/Electrones Secundarios que son usados en combinación para generar las imágenes y el análisis de la muestra. El detector de electrones secundarios usa los electrones secundarios de una muestra para producir una imagen de la superficie de la muestra, el detector Backscatter usa los electrones retrodispersados de la muestra para producir una imagen basada en el número atómico promedio, mostrando las variaciones composicionales. El detector EDS de Rayos-X permite el análisis de los Rayos-X de la muestra con el propósito de semi- cuantizar y cualitizar el análisis químico. La técnica permite el análisis de muestras con preparación o sin esta, a diferencia de la técnica de alto vacío que necesita de un recubrimiento de una película conductora en la superficie de la muestra.¹⁷

4.3 MAPEO ELEMENTAL.

Un mapa de elementos es una imagen que muestra la distribución espacial de elementos en una muestra. Dicha imagen se obtiene a partir de una sección pulida en una sección 2D. Los mapas de elementos son extremadamente útiles para mostrar distribuciones de elementos en contexto textural, particularmente para mostrar la zonación composicional. La imagen se produce progresivamente

¹⁷ University of Exeter, “Geochemical, sedimentological and mineralogical analysis, Low Vacuum SEM”, 2015.

trazando el haz de electrones punto por punto sobre un área de interés. El mapa de elementos se compara en una imagen pixel por pixel (mapa de bits) basada en elementos químicos. La resolución es determinada por el tamaño del haz, y la respuesta relativa de cada elemento está determinada por la duración del haz en cada punto (y por supuesto la concentración real). Puede hacerse una mayor distinción mediante análisis que tomen más tiempo ¹⁸

El mapeo elemental puede usarse para interpretar la anatomía y la tafonomía de fósiles conservados, tal como se muestra en el trabajo realizado por Orr et al en 1998, el cual realiza dicha técnica sobre el molde fosilizado de un trilobite con el objetivo de conocer y entender los procesos del reemplazamiento de sus partes blandas durante los procesos diagenéticos. Esta técnica permitió identificar la abundancia relativa de elementos en diferentes partes de los fósiles del Burgess Shale y la matriz adyacente. La matriz adyacente a los especímenes exhibe concentraciones relativamente constantes de cada elemento: así, partes del fósil pueden ser consideradas como elevadas o empobrecidas en comparación con el sedimento circundante.

4.4 TIPOS DE MUESTRAS ANALIZADAS

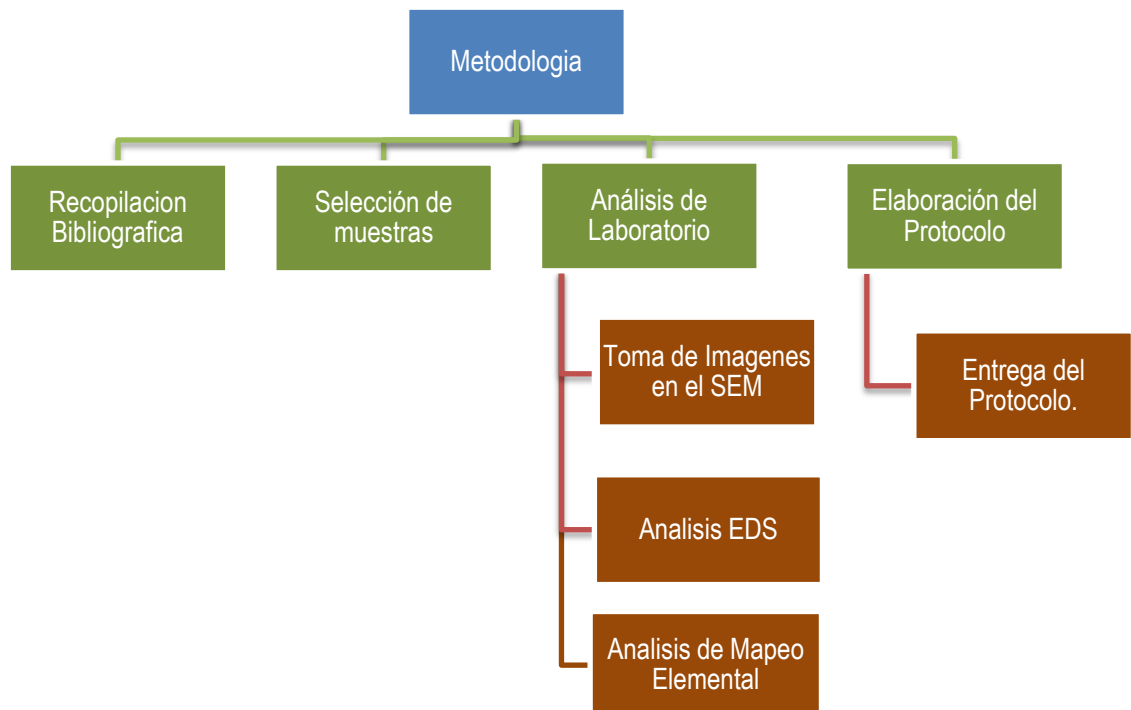
Las muestras analizadas en el microscopio electrónico de barrido de la UIS se encuentran en diferentes tipos de conservación, las cuales se pueden nombrar como: reemplazamiento del exoesqueleto calcáreo por la composición silícea propia de la misma roca huésped, moldes internos, impresiones y moldes recubiertos por una pátina de hierro.

¹⁸ GOODGE, J., “Element Mapping” [En Línea]. 2015. Disponible en Internet: https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/elementmapping.html

5. METODOLOGÍA

El procedimiento a seguir en el diseño de un protocolo aplicado al análisis de muestras fósiles se encuentra resumido en la figura 2.

Figura 2. Diagrama del proceso de Investigación.



5.1 RECOPIACIÓN BIBLIOGRÁFICA

En esta primera etapa se realizó una recopilación de la literatura concerniente a estudios nacionales e internacionales. La siguiente información que se centró en la utilización del microscopio electrónico de barrido en lo referente al análisis morfológico de los fósiles, seguido de información sobre análisis de EDS para la comprensión de la composición mineralógica, tafonomía y procesos diagenéticos.

El motor de búsqueda principal escogido fue la información de la base de datos de la Universidad Industrial de Santander (Science Direct, ELSEVIER, Science OnLine), igualmente se desarrolló la búsqueda de artículos descargados a través del buscador Google Académico, con boletines nacionales (Boletín de Geología) y a su vez con manuales de manejo y clasificación del Microscopio Electrónico de Barrido.

5.2 SELECCIÓN DE MUESTRAS

Se realizó un proceso de selección del material apto para el estudio en el microscopio de electrónico de Barrido en donde se llega a la conclusión que para la implementación de un protocolo estándar del SEM es necesario la recolección de variedad de muestras, por consiguiente, se procedió a utilizar muestras fósiles recolectadas previamente por los profesores Javier Jerez-Jaimes y Ricardo Amorocho.

Las muestras fósiles analizadas fueron recolectadas en su mayoría en la base de la Formación Floresta del Devónico medio, en el sector aflorante del municipio de Floresta, Boyacá, la cual se caracteriza por presentar arcillolitas de tonos

amarillentos, con intercalaciones de limolitas del mismo tono fosilíferas (ANH, 2006). Los fósiles correspondientes al subfilo vertebrata fueron recolectados en la base de la formación Rosablanca aflorante en el cerro La Vieja, aledaño al municipio de Zapatoca, Santander, esta se encuentra compuesta por niveles de calizas y dolomitas intercaladas con calizas de color marrón, un nivel margoso seguido de niveles de shales intercalados con calizas¹⁹. El espécimen de foraminífero fue recolectado de la Formación los Pinos ubicada cerca al municipio de Samacá, Boyacá, en el sector de recolección predominan los paquetes blandos de limolitas negras a verdes en capas medias a muy gruesas con intercalaciones de areniscas cuarzosas en capas medias a delgadas con estratificación ondulada paralela²⁰.

Las muestras fósiles que se evaluaron en este proceso se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Especímenes analizados en el estudio.

Grupo	Taxa	Tipo	Periodo
Trilobita	<i>Viaphacops cristata</i>	Autigénico	Devónico Medio
Trilobita	<i>Colombianaspis carvalhoe</i>	Autigénico	Devónico Medio
Briozoa	<i>Fenestella harrisi</i>	Autigénico	Devónico Medio
Braquiópoda	Nd	Duripatrica	Devónico Medio
Foraminífera	<i>Orthokarstenia ewaldi</i>	Autigénico	Cretácico Superior
Bivalva	Nd	Duripatrica	Cretácico Inferior
Vertebrata	Plesiosauridae	Permineralización	Cretácico Inferior
Vertebrata	Pliosauridae	Permineralización	Cretácico Inferior
Vertebrata	Picnodontidae	Permineralización	Cretácico Inferior

Nd: No determinado.

¹⁹ BEDOYA, C., NOMESQUI, H., “Estratigrafía y Petrografía de la formación Rosablanca: implicaciones para la identificación de eventos anóxicos oceánicos en la Cordillera Oriental colombiana”. 2013

²⁰ CRUZ, L. JEREZ-JAIMES, J.H.” caracterización físico química, tafonomía y ecología de *orthokarstenia ewaldi* (foraminífera: siphogenerinoididae) de la formación los pinos (cretácico: maastrichtiano) de samacá (boyacá, colombia). 2011

5.3 ANÁLISIS DE LABORATORIO.

Para el análisis de las muestras en el Microscopio Electrónico de Barrido en condiciones de alto vacío fue necesaria una serie de pasos preparatorios.

- Primero se secaron las muestras en una mufla, proceso que requería de mínimo 10 horas a una temperatura de 70 a 80 grados centígrados aproximadamente. La importancia de este paso radica en la eliminación de todo rastro de humedad en la muestra con la finalidad de que sea óptima para realizar el vacío en el siguiente proceso de recubrimiento.
- El siguiente paso consistió en el recubrimiento de Carbono a partir de grafito en la superficie que se va a analizar en el microscopio electrónico de barrido. El proceso del recubrimiento se realiza en la maquina evaporadora Quórum Q150R (Figura 3) que elimina la humedad restante y permite la adherencia del Carbono. La capa de carbono es necesaria debido a que previene la acumulación de electrones sobre la superficie por la conductividad estática, accediendo a una mejor resolución en el desarrollo de imágenes por parte del microscopio.

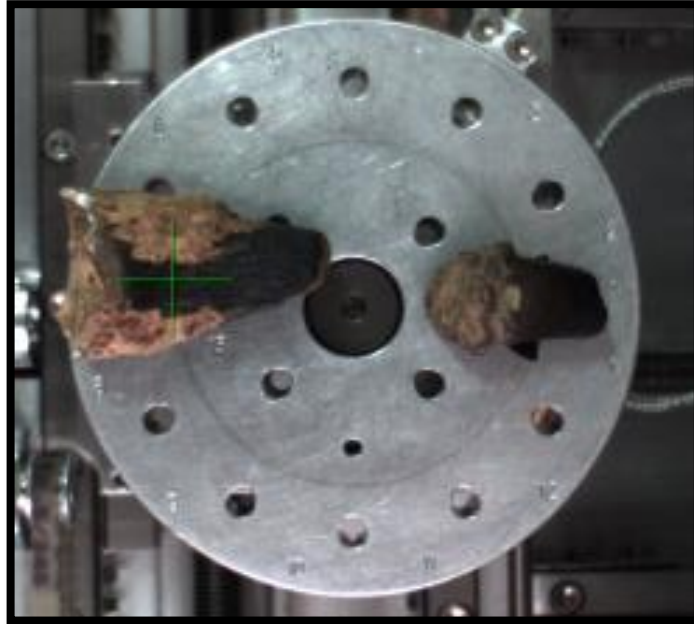
Figura 3. Máquina Evaporadora Quórum Q150R usada para el recubrimiento de las muestras



Análisis en condiciones de bajo vacío: solo fue necesario realizar una limpieza superficial de la muestra, en la cual se eliminaba todo tipo de impurezas que pudieran afectar con el resultado final del análisis de la muestra.

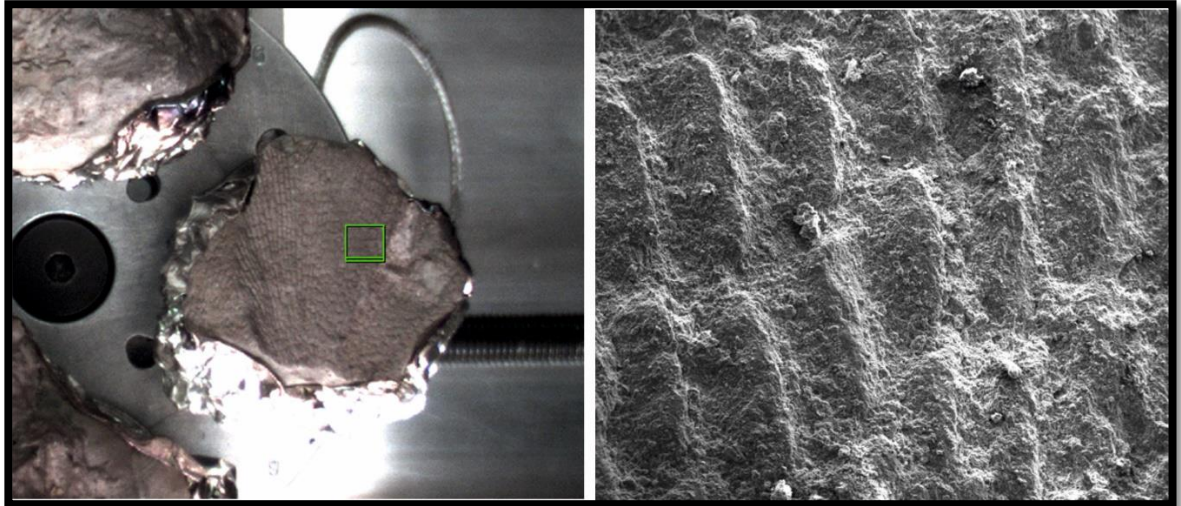
Análisis en el SEM: Cuando la muestra estuvo libre de humedad y rastros de suciedad se procedió con el análisis en el microscopio electrónico de barrido (Figura 4). Este paso se enfocó en dos objetivos, el análisis morfológico de las especies en pequeñas escalas con alta resolución y el análisis composicional EDS.

Figura 4. Muestras de dientes fósiles montadas dentro del Microscopio Electrónico de Barrido antes de ser analizadas.



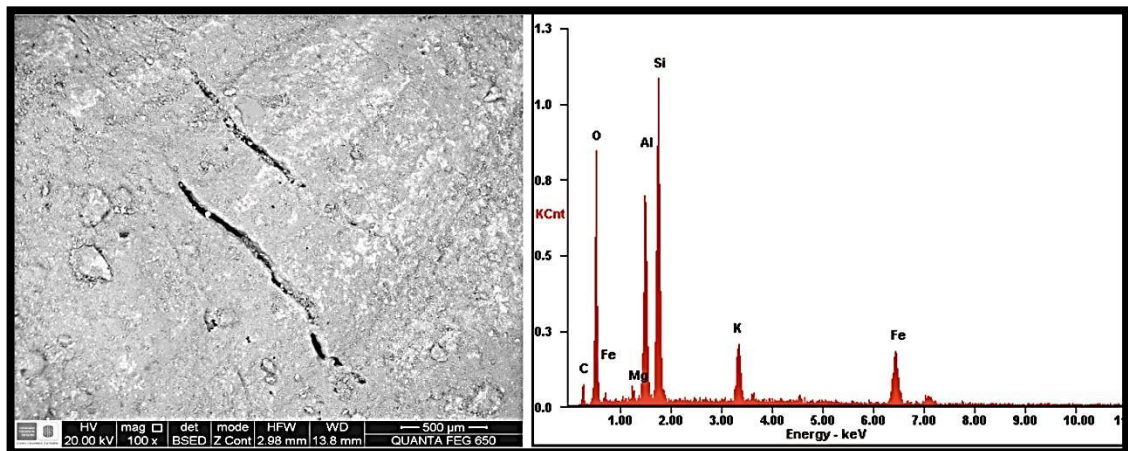
- Las muestras que fueron analizadas fueron escogidas según su grupo taxonómico, tipo de roca en la que se encontró y según su estado de conservación. El objetivo de este proceso fue identificar partes morfológicas (Figura 5) que no son apreciables a simple vista o por su estado de conservación en la fosilización no sean apreciables a escalas macroscópicas.

Figura 5. Imagen de electrones secundarios (SE) mostrando los principales rasgos morfológicos del Genero *Fenestella harrisi*.



- Una vez realizado el registro fotográfico se procedió a escoger puntos relevantes en cuanto a la estructura mineral para ser analizados composicionalmente con las herramientas de análisis EDS del SEM. Para esto se observaron los cambios texturales apreciados en imágenes a una escala de 100µm a 200µm, asimismo las imágenes usadas para la selección del punto fueron creadas por electrones retro dispersados (ER) (Figura 6).

Figura 6. Análisis EDS, para una concha de Braquiópodo del Devónico. Nótese el espectro característico de este material y la silicificación del mismo.



5.3.1 Análisis de los Resultados. Una vez obtenidos los resultados de los análisis EDS y las imágenes de las microestructuras, son comparados con las que se encuentran en el atlas de petrología SEM de Joann E. Welton (2003) con el fin de determinar el nombre del mineral del micro cristal estudiado. El libro muestra los hábitos de los microcristales y los resultados EDS estándar para cada uno de estos minerales, usando esto como guía es posible nombrar los minerales que han reemplazado los antiguos componentes orgánicos de los actuales fósiles.

5.3.2 Análisis de Mapeo Elemental. La técnica del análisis de mapeo elemental o Mapping, permite determinar la cantidad aproximada de un elemento químico ubicado espacialmente en la muestra, mediante un examen semicuantitativo. Se realiza un análisis textural de la muestra en donde se aprecia las diferentes intensidades en la imagen dependiendo del elemento que se requiera conocer.

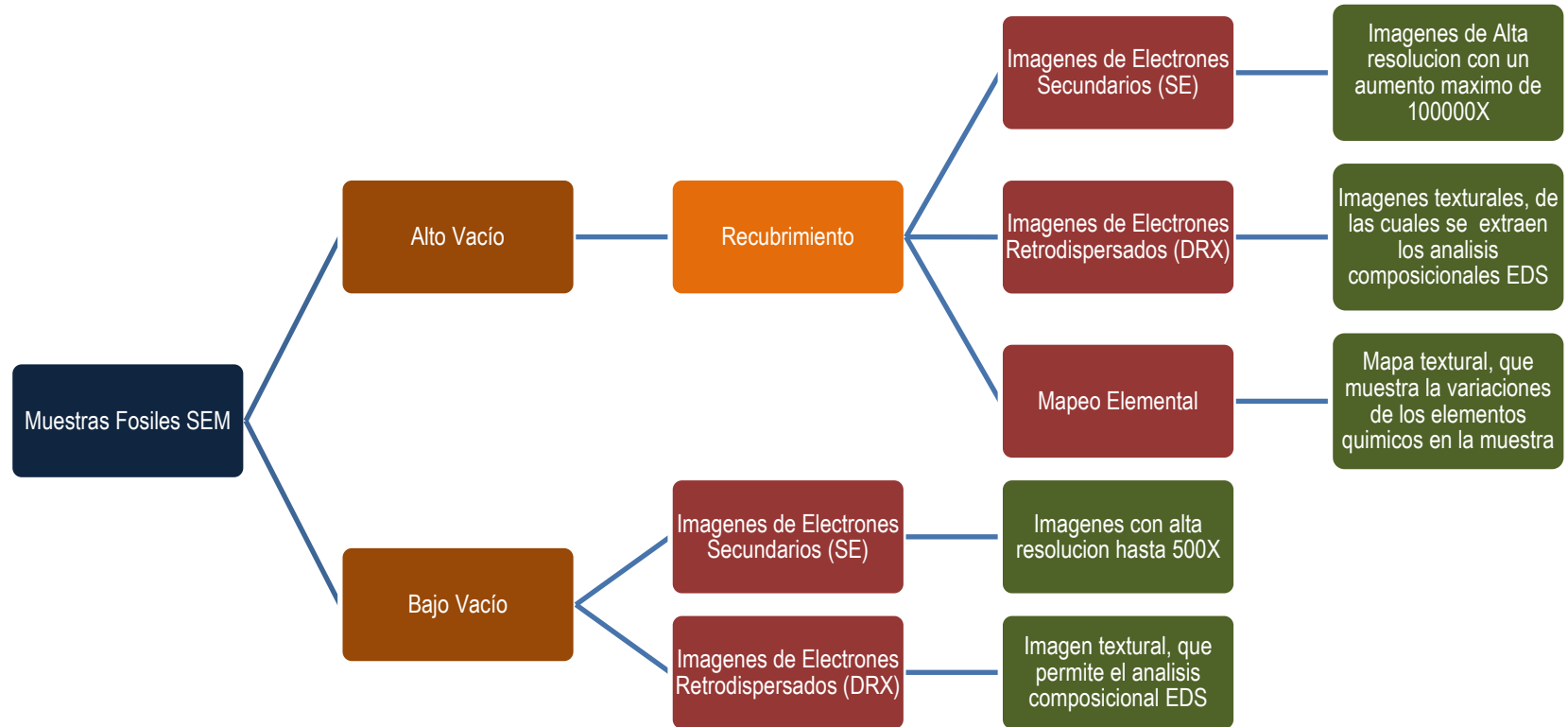
Esta técnica requiere de una muestra que posea una superficie que en su mayoría sea plana, necesariamente debe tener un recubrimiento para muestras no conductoras, el tiempo estimado puede variar entre una y tres horas y esto depende del tamaño del detector que se posea, en el caso del equipo de la escuela son necesario tres horas, ya que el detector EDS es pequeño. Para esta prueba se escogió una muestra de briozoo *Fenestella harrisi* (Figura 7) que poseía una superficie plana.

Figura 7. Segmento de una colonia del briozoo *Fenestella harrisi* que se analizó mediante el mapeo elemental.



5.3.3 Establecimiento de un Protocolo. El protocolo se realiza con base en las necesidades del geólogo al momento de realizar el estudio de muestras fósiles. Dentro de estos criterios se encuentran el tipo de muestra, tiempo requerido y clase de resultados que se pretenda obtener. Con base a este orden de ideas se realiza un mapa conceptual que muestra las variables que permite analizar el microscopio electrónico de barrido de la UIS para una muestra fósil (Figura 8).

Figura 8. Análisis que se puede realizar con el Microscopio Electrónico de Barrido de la UIS.



6. RESULTADOS

Para la comprensión de cada análisis con el microscopio electrónico de barrido, se desarrollaron experimentos con ejemplos de preguntas que se pueden resolver usando este equipo.

6.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO CON RECUBRIMIENTO

El uso del Microscopio Electrónico de Barrido en muestras fósiles permite el reconocimiento de morfologías que no son apreciables a simple vista, debido a que permite el registro de imágenes de alta resolución a magnificaciones muy altas. El recubrimiento en este caso de grafito es necesario debido a que permite generar una superficie conductora sobre la muestra, obteniendo imágenes en Electrones Secundarios de mayor calidad.

Pasos a Seguir:

1. Limpieza de la muestra con brochas o pinceles, se requiere que la superficie que se va a analizar este limpia.
2. Si la muestra presenta humedad, deberá pasar 10 horas en un horno o mufla a temperaturas entre 70 – 80 grados Celsius.
3. Recubrir la muestra con un material conductor como grafito u oro, en la maquina evaporadora Quórum Q150R del laboratorio de Microscopia.
4. Realizar el montaje en el Microscopio Electrónico de Barrido en condiciones de alto vacío.
5. Escoger los rasgos morfológicos que se deseen observar en detalle.
6. Registrar imágenes con Electrones Secundarios en diferentes magnificaciones.

7. Estudiar los rasgos morfológicos de las microestructuras observadas en la muestra fósil.

Se analizaron diferentes muestras fósiles, entre las que se incluyen Trilobites, Braquiópodos y Briozoos, los cuales fueron recolectados en diferentes puntos de la Formación Floresta, en lugares cercanos al municipio de Floresta, Boyacá. Estos especímenes fueron seleccionados debido a su estructura arcillosa, implicando la necesidad de recubrimiento para un registro de imágenes en alta resolución de imágenes en electrones secundarios, debido a que estas no poseen buena conductividad.

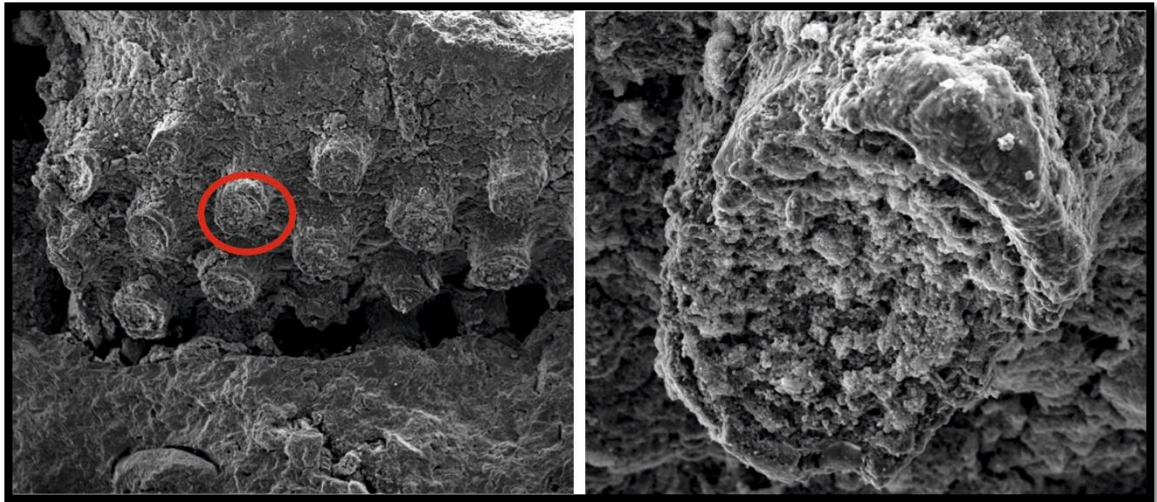
6.1.1 Ejemplo Práctico 1: Análisis del ojo del *Viaphacops cristata* (Trilobita).

¿Cuál es la estructura y morfología del ojo del *Viaphacops cristata*?

En el desarrollo de este análisis se siguieron los pasos propuestos, se realizó la limpieza de la superficie de la muestra fósil, luego se prosiguió a la deshidratación y recubrimiento con grafito.

Las imágenes de Electrones Secundarios (figura 9) de magnificaciones de 250x y 800x, revelan detalles morfológicos de los lentes oculares, en el que se conserva su forma Schizochroal (Figura 9), característica de los trilobites pertenecientes al orden Phacopida, siendo este un rasgo morfológico que contribuye a su clasificación.

Figura 9. Imagen de electrones secundarios (SE) mostrando los principales rasgos morfológicos del ojo y las lentes esféricas del Trilobite *Viaphacops cristata* de la Formación Floresta (Macizo de Floresta).



6.2 ANÁLISIS EDS CON RECUBRIMIENTO.

El análisis composicional de Espectrometría de Energía Dispersiva (EDS) permite conocer un porcentaje cuantitativo de los elementos químicos que componen la muestra, con estos datos es posible determinar los minerales que han reemplazado las partes orgánicas de las muestras fósiles y poder determinar procesos diagenéticos.

Pasos que deben ser seguidos:

1. Limpieza de la muestra con brochas o pinceles, se requiere que la superficie que se va a analizar este limpia.
2. Si la muestra presenta humedad, deberá pasar 10 horas en un horno o mufla a temperaturas entre 70 – 80 grados Celsius.

3. Recubrir la muestra con un material conductor como grafito u oro, en la maquina evaporadora Quórum Q150R del laboratorio de Microscopia.
4. Realizar el montaje en el Microscopio Electrónico de Barrido.
5. Escoger los puntos que muestren posibles cambios composicionales, como cambios de color y textura.
6. Tomar imágenes de Electrones Retrodispersados a diferentes magnificaciones.
7. Reconocer cambios texturales en las imágenes de Electrones Retrodispersados con el fin de reconocer los posibles cambios de composición.
8. Escoger los puntos y proceder al análisis composicional EDS.

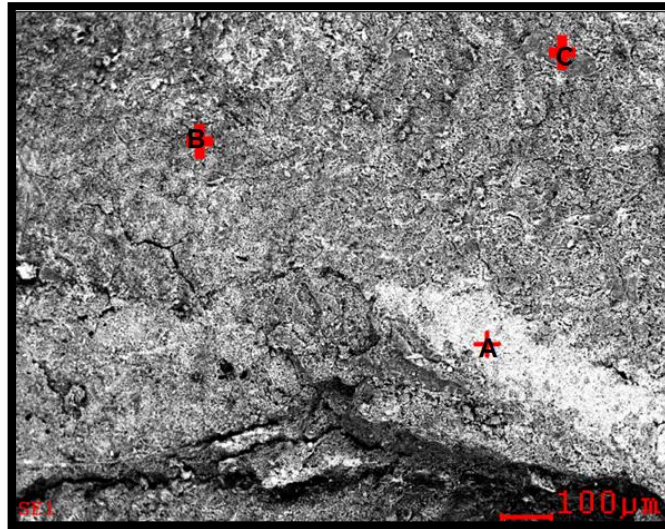
Para la ejemplificación del protocolo para el análisis EDS se desarrollaron tres ejercicios utilizando tres especies de fósiles: *Colombianaspis carvalhoe* (Trilobita), Braquiópodos y *Fenestellas harrisi* (Bryozoa).

6.2.1 Ejemplo Práctico 2: Variación composicional de *Colombianaspis carvalhoe* (Trilobita)

¿La composición química del Trilobite es afectada por la oxidación de la roca circundante?

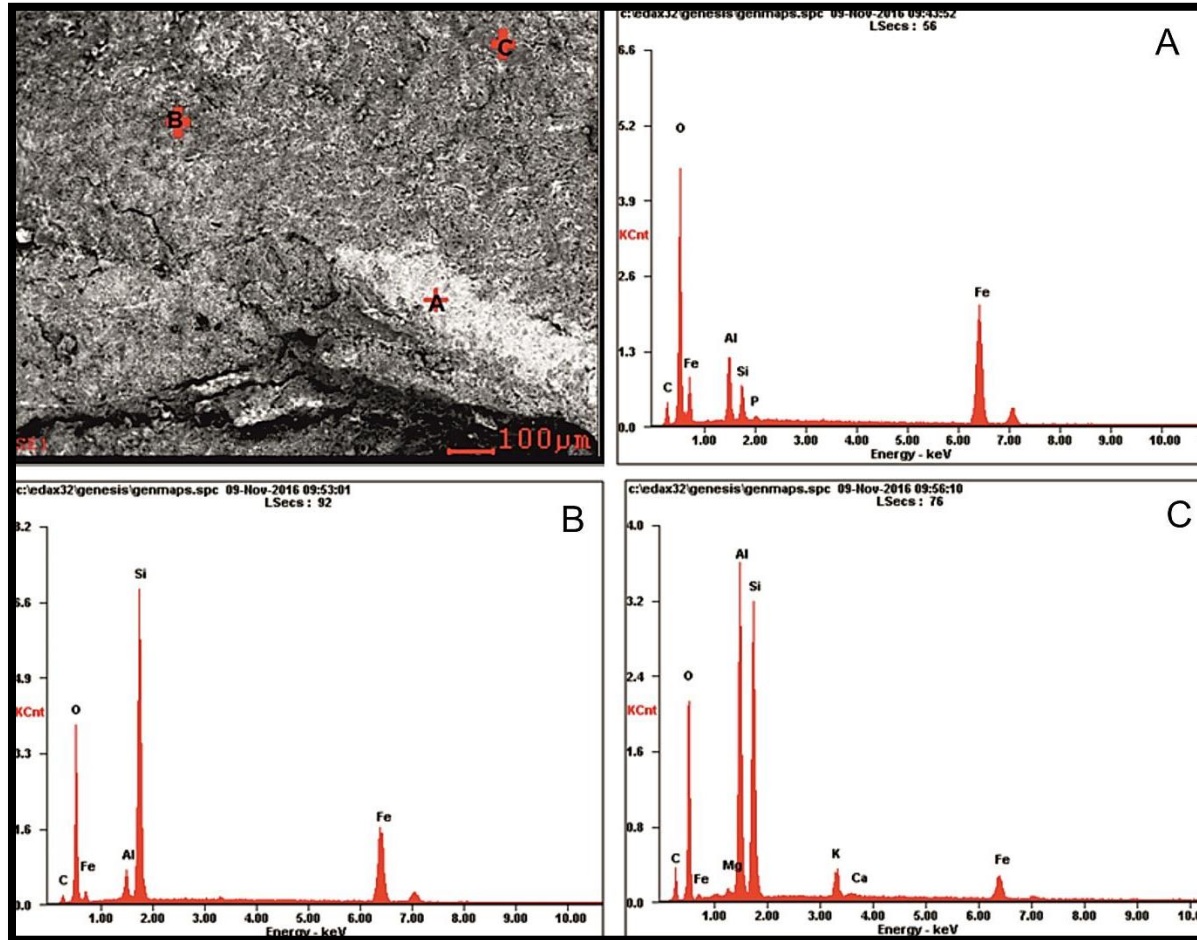
Se aplicó el protocolo propuesto anteriormente, una vez montada la muestra en el microscopio se registraron imágenes de electrones retrodispersados (EDX) con las cuales se observaron los cambios de textura para luego seleccionar los puntos a ser analizados bajo el detector Edax.

Figura 11. Imagen de Electrones Retrodispersados de la región del Trilobite con los puntos analizados mediante la técnica EDS.



En los resultados de los análisis EDS para el *Colombianaspis carvalhoe*, de la Formación Floresta, la composición mineralógica del fósil corresponde a un reemplazamiento de sus partes duras en minerales silíceos (Figuras 12, 13 y 14). En el punto A (Figura 12) se aprecia que se encuentran una mezcla de minerales silíceos con óxidos, la presencia de estos óxidos es debido a la alteración de la roca encajante, en el punto B (Figura 13) se logró determinar que corresponde con cristales de Feldespato Plagioclasa debido a su composición química ($\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$) y por último en el punto C (Figura 14) se evidencia un aumento significativo del elemento Aluminio (Al) correspondiente a procesos de alteración correspondientes al mineral Caolinita $(\text{Al}_4(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})^8$, el cual es producto de la alteración del mineral feldespato Plagioclasa. Por lo tanto, se puede concluir que los procesos de oxidación afectan también la composición química del fósil.

Figura 12. Imagen en electrones retrodispersados con los puntos analizados. A. Espectro elemental de la región A del fósil *Colombianaspis carvalhoe*. B. Espectro elemental de la región B del fósil *Colombianaspis carvalhoe*. C. Espectro elemental de la región C del fósil *Colombianaspis carvalhoe*

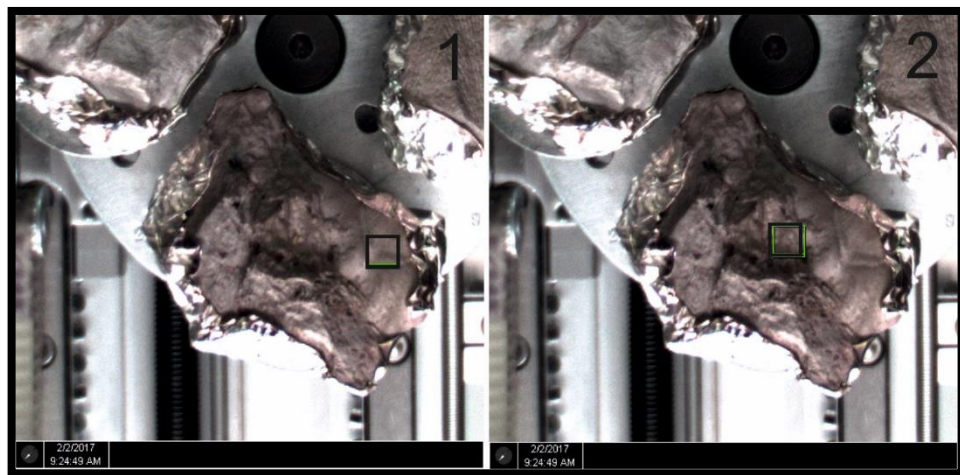


6.2.2 Ejemplo Práctico 3: Variación composicional del Braquiópodo B30

¿La coloración rojiza del braquiópodo es necesariamente producto de oxidación?

Se registraron imágenes de electrones retrodispersados para realizar los análisis y fueron seleccionados dos puntos en la muestra con el fin de comparar los resultados de los análisis EDS (Figura 15).

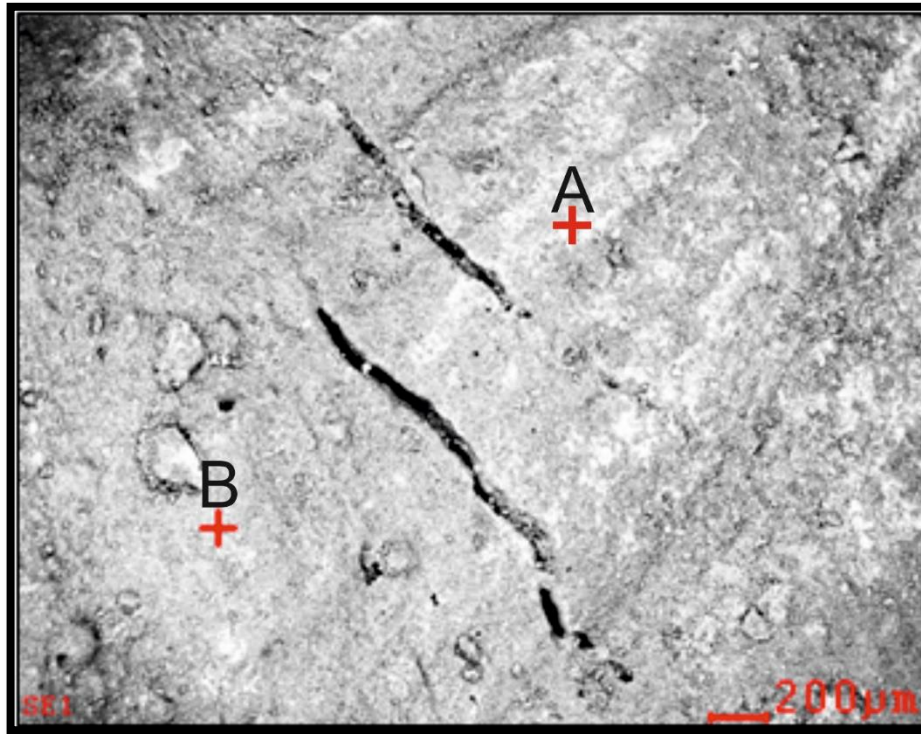
Figura 13. Regiones analizadas con electrones retrodispersados en las cuales se realizaron los análisis EDS, a la izquierda la región 1 y región 2.



Una vez fueron seleccionadas las regiones se registraron las imágenes de electrones retrodispersados a magnificaciones de 100x.

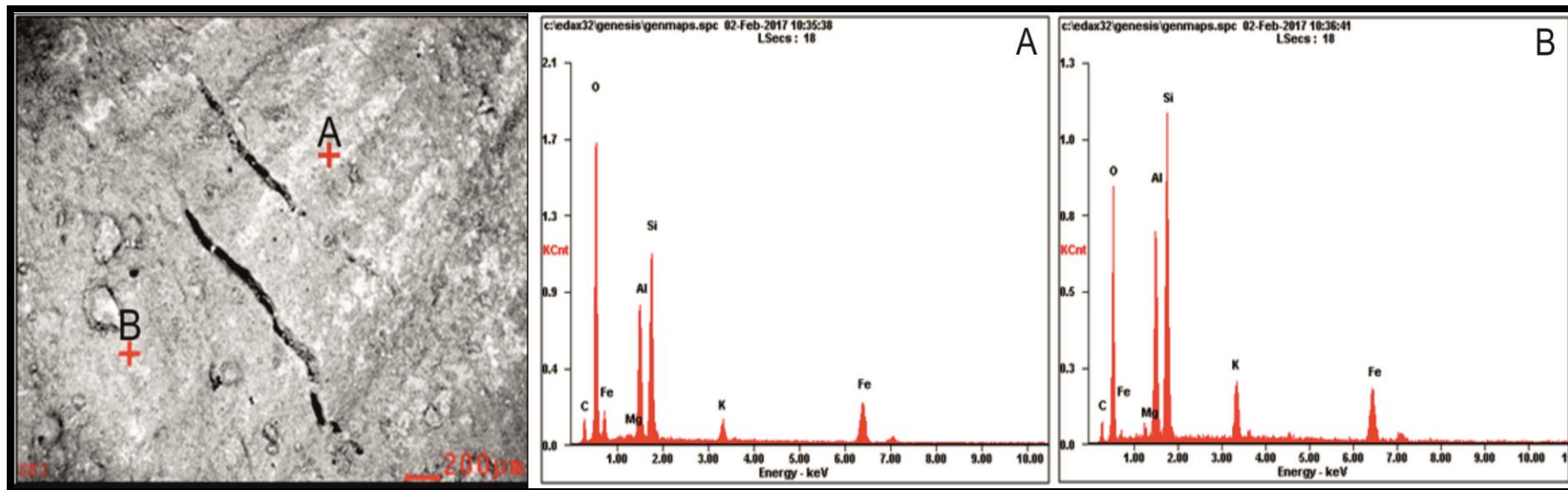
6.2.2.1 Análisis composicional EDS de la Región 1.

Figura 14. Electrones retrodispersados a 100x del Braquiópodo B30 en la región 1 con los puntos escogidos para el análisis EDS.



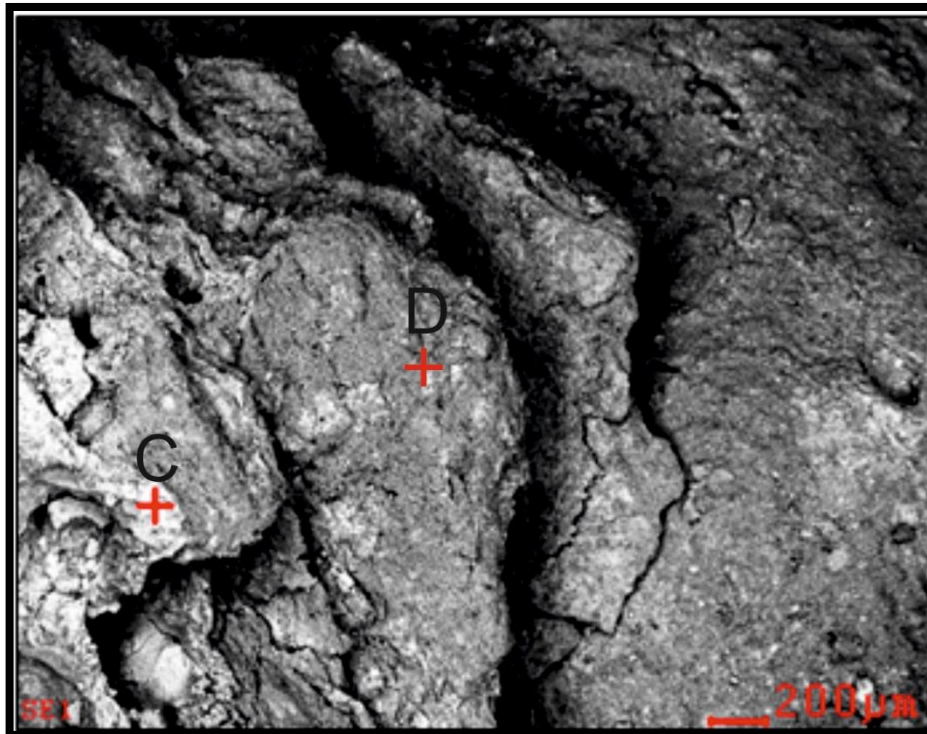
Las secciones A y B de la región 1 muestran composición química similar (Figuras 17 y 18).

Figura 15. Imagen de electrones retrodispersados con las secciones analizadas. A. Espectro composicional de la región 1 sección A. B. Espectro composicional de la región 1 sección B.



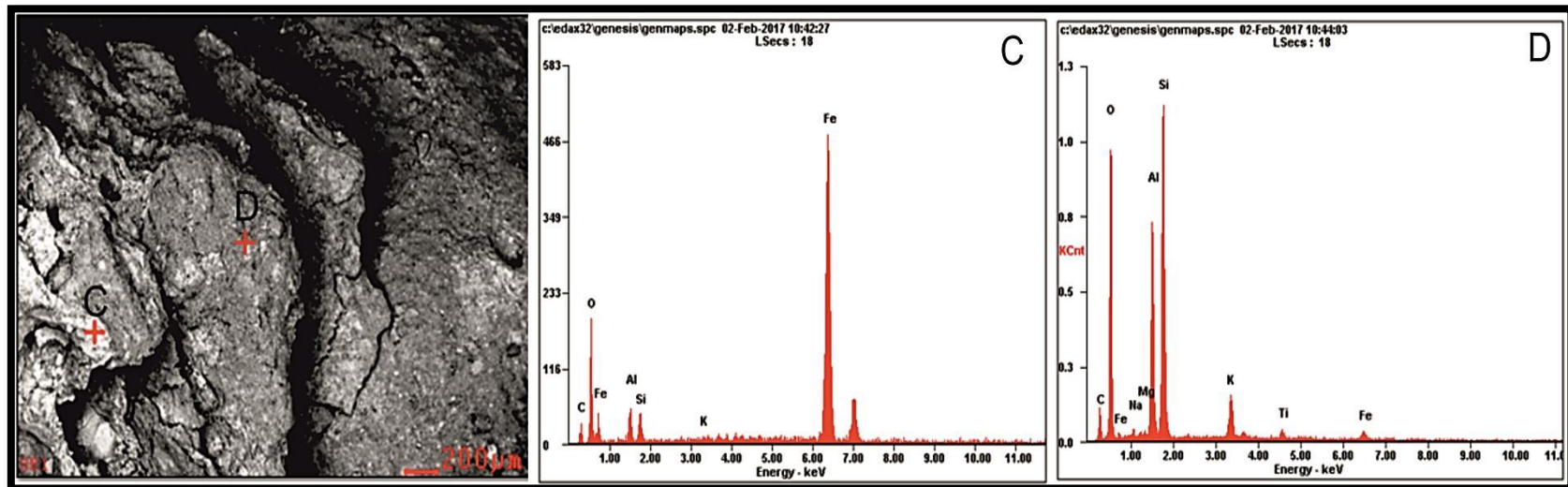
6.2.2.2 Análisis composicional EDS de la Región 2.

Figura 16. Imagen de electrones retrodispersados a 100x del Braquiópodo B30 con los puntos escogidos para el análisis EDS de la Región 2.



Los resultados de análisis EDS revelan que la composición elemental de la muestra se basa en minerales aluminosilicatados (Figura 17, 18 y 21) en su mayoría plagioclasa alterada o Sericita, sin embargo se presentan niveles considerables de Hierro y Oxígeno (Figura 20) en algunos puntos, demostrando que la muestra presenta niveles de oxidación, por tanto la coloración rojiza original es producto de la oxidación que presenta la muestra debido a procesos de meteorización de la roca en la que se encontraba encajada.

Figura 17. Imagen de electrones retrodispersados con las secciones analizadas. C. Espectro composicional de la región 2 sección C. D. Espectro composicional de la región 2 sección D.

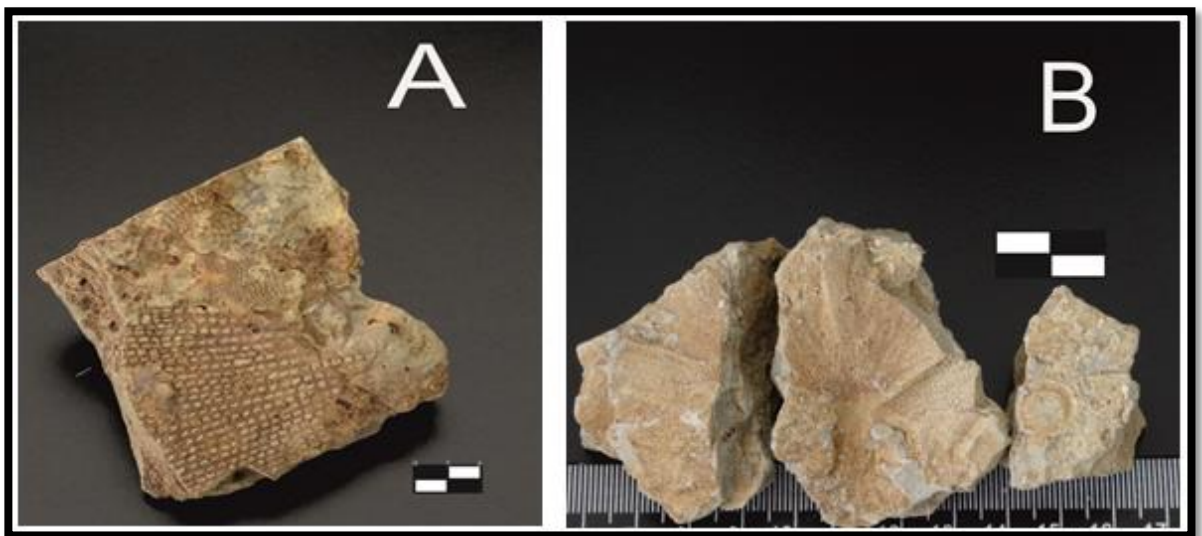


6.2.3 Ejemplo Práctico 4: Variación composicional del briozoo *Fenestella harrisi*.

¿Existe variación en la composición química de los zoarios *Fenestella harrisi* encontrados en la base de la formación Floresta con los recolectados metros más arriba?

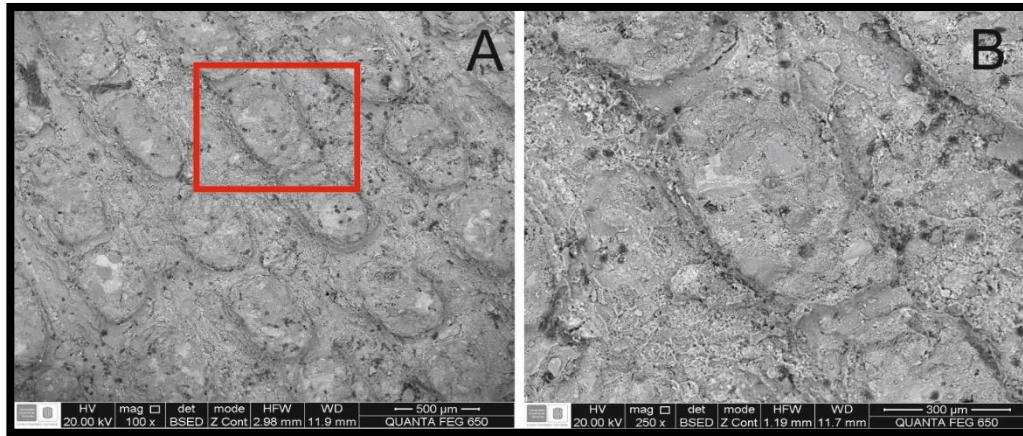
Se tomaron dos muestras de los zoarios de *Fenestella harrisi* de diferentes ubicaciones de la columna, luego fue utilizado el protocolo propuesto. Las muestras fueron secadas y fueron recubiertas en grafito para realizar el montaje en el microscopio electrónico de barrido. Se registraron las imágenes de electrones retrodispersados y se escogieron los puntos para realizar los análisis EDS.

Figura 18. Muestras de Briozoo *Fenestella harrisi* analizadas. A. Muestra M-16 procedente del yacimiento Monticelo en la base de la Formación Floresta. B. Muestra Fen13 recolectada metros más arriba en la columna de la Formación Floresta.



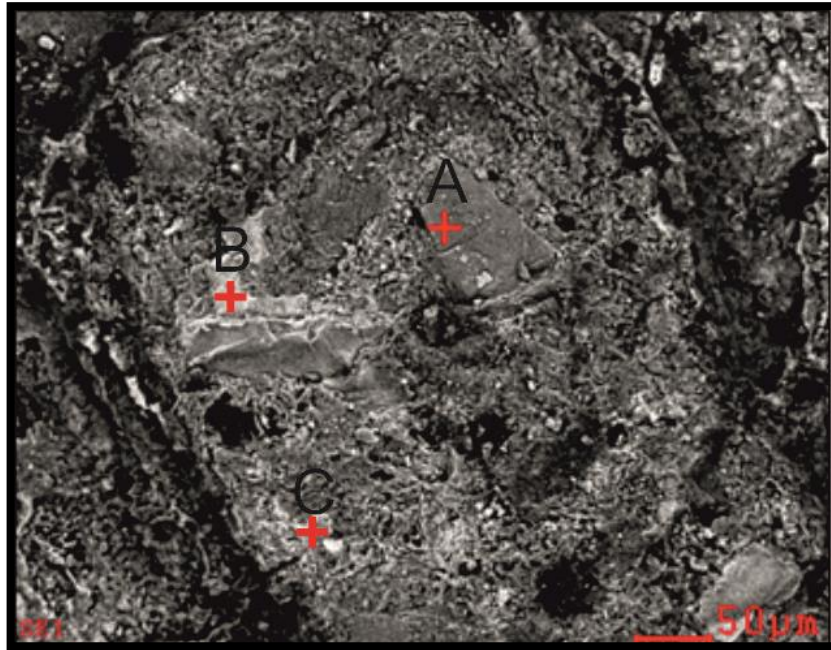
Realizado el montaje se continuó con el registro de imágenes de electrones retrodispersados comenzando con la muestra M-16 (Figura 22A).

Figura 19. Imágenes en electrones retrodispersados de la muestra M-16. A. Imagen a 100x. B. Imagen a 250x.



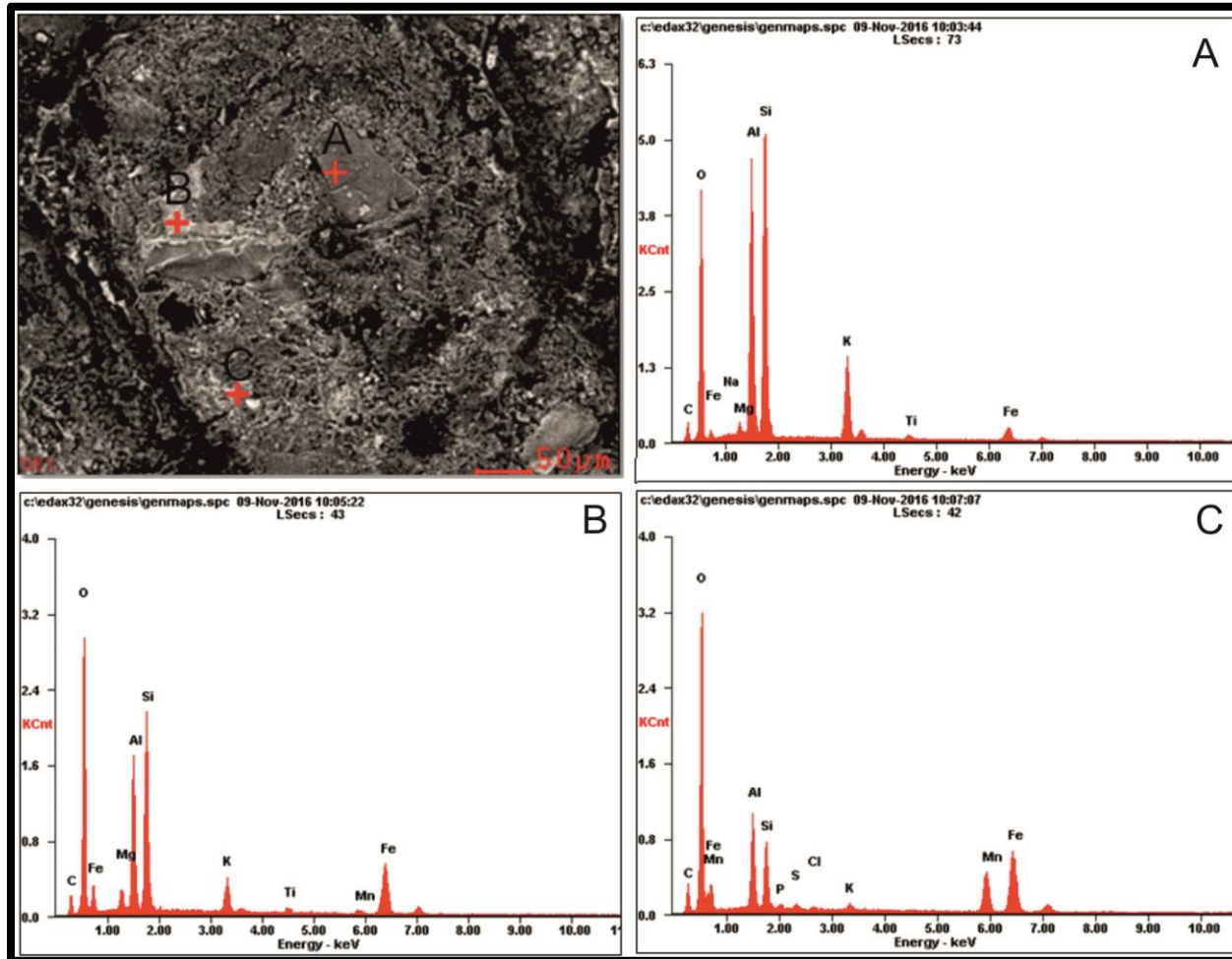
Se seleccionaron dos puntos dentro de la imagen para los análisis EDS de composición elemental.

Figura 20. Imagen de electrones retrodispersados a 400x de la muestra de *Fenestella harrisi* M-16 con los puntos seleccionados para el análisis EDS.



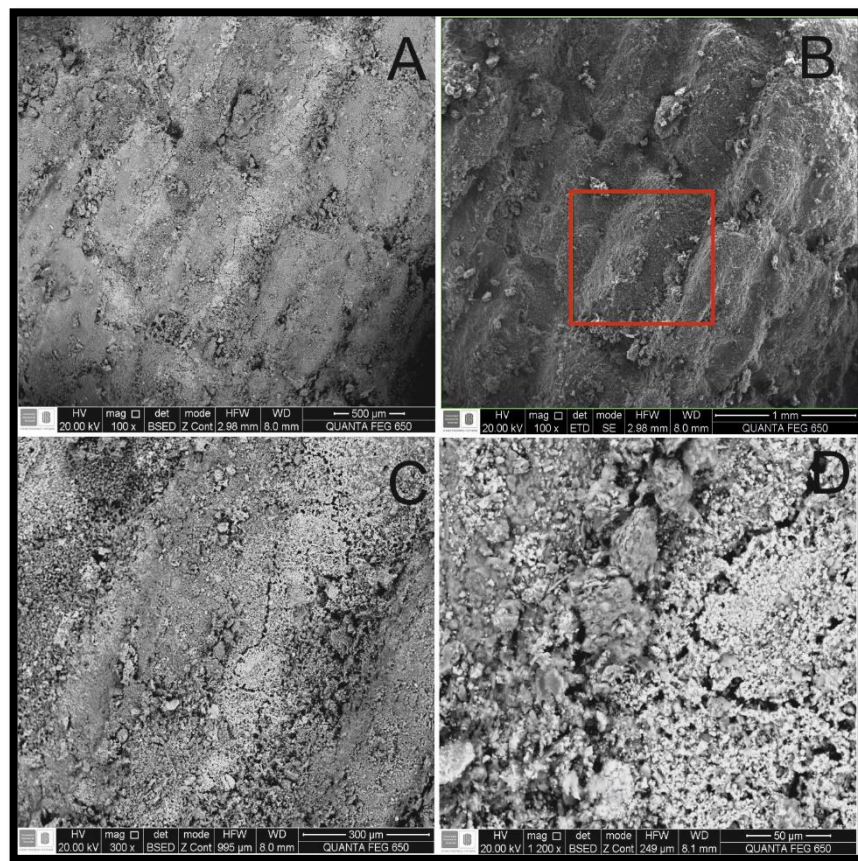
Los resultados de la muestra M-16 (Figura 22A) permiten interpretar que en su mayoría está compuesta por aluminosilicatos (Figuras 25,26 y 27), en especial de feldespato potásico ($KAlSi_3O_8$).

Figura 21. Imagen en electrones retrodispersados con los puntos analizados. A. Espectro composicional de la *Fenestella harrisi* en el punto A. B. Espectro composicional de la *Fenestella harrisi* en el punto B. C. Espectro composicional de la *Fenestella harrisi* en el punto C.



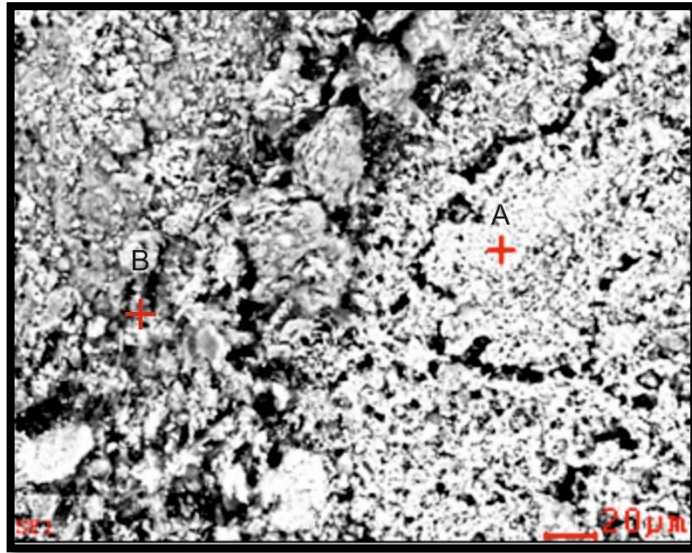
Luego se realizó el montaje de la muestra Fen13 (Figura 22B) y el posterior registro imágenes de electrones retrodispersados.

Figura 22. Imágenes obtenidas en el Microscopio Electrónico de Barrido de *Fenestella harrisi* Fen13. A. Imagen en electrones retrodispersados a 100x. B. Imagen de electrones secundarios a 100x. C. Imagen de electrones retrodispersados a 300x. D. imagen de electrones retrodispersados a 1200x en la que se realiza el análisis EDS.



Se seleccionaron dos puntos de la imagen para realizar el análisis EDS para conocer su composición.

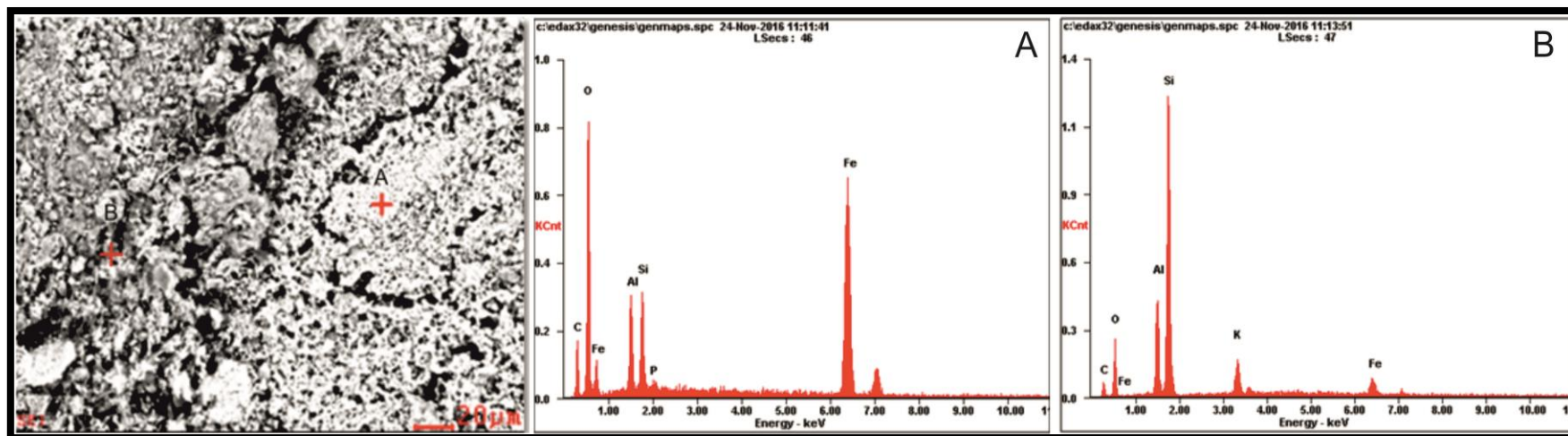
Figura 23. Imagen de electrones retrodispersados de *Fenestella harrisi* Fen13 a 1200x con los puntos de análisis EDS.



Como se observa en los resultados de los análisis EDS (Figuras 30 y 31), la muestra está compuesta principalmente por minerales aluminosilicatados, sin embargo, se aprecia la presencia de óxidos de hierro (Figura 32) producto de los procesos de meteorización de la roca en la que se encontraba.

Las dos muestras, aunque presentan características físicas diferentes, como color, dureza y fragilidad poseen la misma composición elemental, no obstante, la muestra Fen13 (Figura 22B) presenta mayor cantidad de óxidos, por tanto, ha sido afectada por procesos mayores de meteorización que la muestra M-16 (Figura 22A).

Figura 24. Imagen de electrones retrodispersados de *Fenestella harrisi* Fen13 con los puntos de análisis EDS. A. Espectro composicional de la *Fenestella harrisi* en el punto A. B. Espectro composicional de la *Fenestella harrisi* en el punto B.



6.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO SIN RECUBRIMIENTO.

El análisis morfológico sin recubrimiento permite reducir tiempo y costos en el proceso del estudio. Este análisis se centra en la toma de imágenes de electrones secundarios en diferentes magnificaciones que permiten determinar las microestructuras del fósil. De igual forma favorece la integridad de los especímenes.

Pasos a seguir:

1. Limpieza de la muestra con pinceles o brocha suave para eliminar partículas sueltas.
2. Muestras húmedas requieren secado en el horno por 10 Horas a 70-80 grados Celsius.
3. Realizar el montaje en el Microscopio Electrónico de Barrido en condiciones de alto o bajo vacío (recomendable el alto vacío).
4. Determinar los rasgos morfológicos que se deseen observar en detalle.
5. Tomar imágenes con Electrones Secundarios en diferentes magnificaciones.
6. Estudiar los rasgos morfológicos de las microestructuras observadas en la muestra fósil.

Se tomó una muestra que contenía la especie de foraminíferos *Orthokarstenia ewaldi* recolectada por el profesor Javier Jerez cerca al municipio de Samacá en la formación Los Pinos (Cretácico Maastrichtiano).

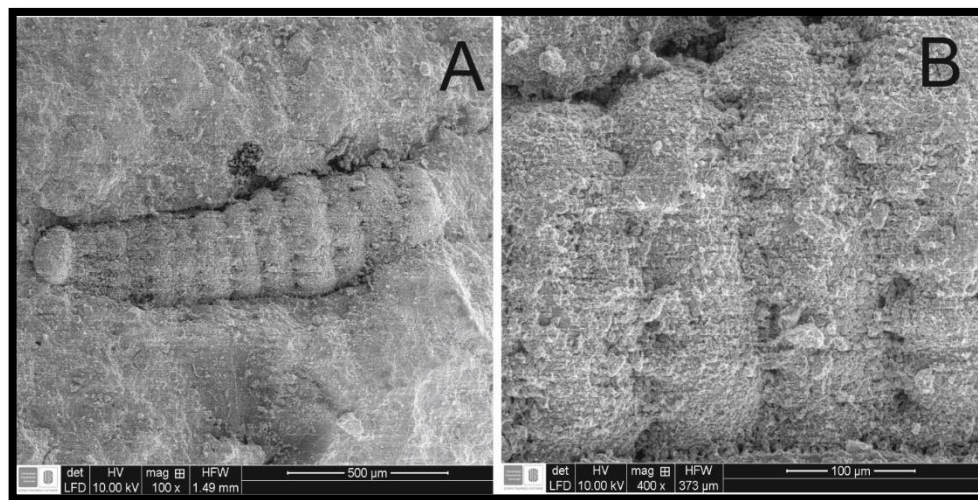
6.3.1 Ejemplo Práctico 5: Análisis Morfológico del Foraminífero *Orthokarstenia ewaldi*.

¿Hay cambios en la estructura de la conchilla del *Orthokarstenia ewaldi*?

Se realiza el protocolo planteado y una vez realizado el montaje en la cámara del microscopio electrónico de Barrido se registraron imágenes de electrones secundarios en magnificaciones de 100x y 400x.

En la figura 32 se aprecian los rasgos característicos del foraminífero, tales como poseer una estructura multilocular de sus cámaras con espinas, reemplazamiento y cambio estructural de la conchilla en minerales con forma de hojuelas debido al reemplazamiento del CaCO_3 a SiO_2 (Cruz et al, 2011)

Figura 25. Imágenes de Electrones Secundarios del Foraminífero *Orthokarstenia ewaldi*. A. Imagen a 100x. B. Imagen a 400x.



6.4 ANÁLISIS EDS PARA MUESTRAS SIN RECUBRIMIENTO.

El análisis EDS permite conocer la composición química de la muestra, usualmente es requerido un recubrimiento conductor para la toma de imágenes en alta resolución en electrones secundarios, sin embargo, en el análisis EDS se requiere solamente las imágenes en electrones retrodispersados los cuales pueden ser obtenidos en superficies con baja conductividad.

Pasos que deben ser seguidos:

1. Limpieza de la muestra con brochas o pinceles, se requiere que la superficie que se va a analizar este limpia.
2. Si la muestra presenta humedad, deberá pasar 10 horas en un horno o mufla a temperaturas entre 70 – 80 grados Celsius.
3. Realizar el montaje en el Microscopio Electrónico de Barrido, es posible usar la técnica de bajo vacío como la de alto vacío.
4. Escoger los puntos que muestren posibles cambios composicionales, como cambios de color y textura.
5. Tomar imágenes de Electrones Retrodispersados a diferentes magnificaciones.
6. Reconocer cambios texturales en las imágenes de Electrones Retrodispersados con el fin de reconocer los posibles cambios de composición.
7. Escoger los puntos y proceder al análisis composicional EDS.

6.4.1 Ejemplo Práctico 6: Composición química de la conchilla y el relleno de un Bivalvo de la formación Rosablanca del cretácico inferior

¿Existen diferencias en la composición química entre el relleno y la concha del Bivalvo?

La muestra fue cortada por la mitad con el fin de obtener datos composicionales de la cubierta de hierro y de su relleno interno, posteriormente se siguió el

protocolo planteado anteriormente. Se realizó el análisis elemental EDS al bivalvo. El objetivo de este examen fue determinar la composición tanto de la capa externa como su interior para lograr establecer diferencias entre estas.

La técnica aplicada para este análisis corresponde al bajo vacío, no se utilizó recubrimiento de grafito ya que el hierro que recubre al fósil permite la conductividad de esta misma para su análisis químico EDS.

Figura 26. Imágenes de Electrones Retrodispersados del Bivalvo. A. Imagen de electrones retrodispersados de la cubierta de Hierro a 5000x. B. Imagen de electrones retrodispersados del relleno de sílice del bivalvo a 10000x.

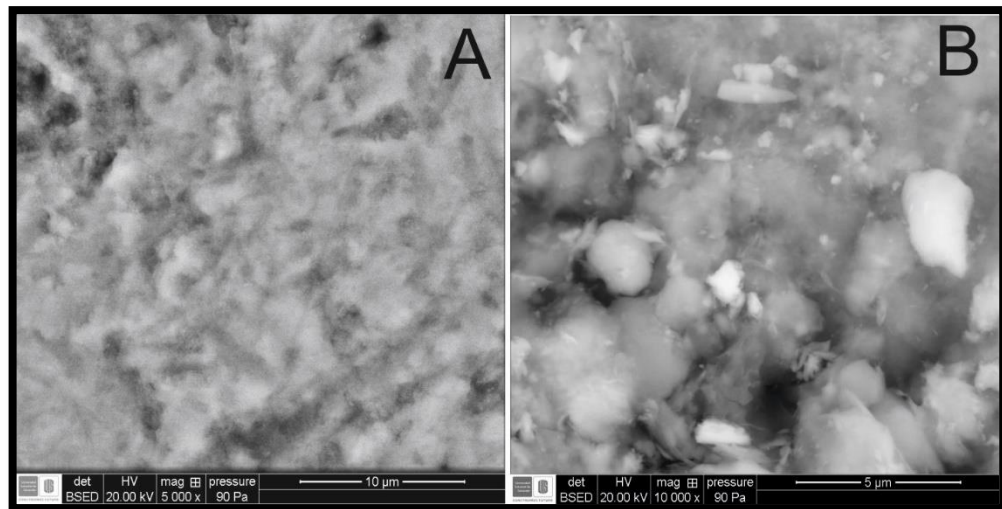
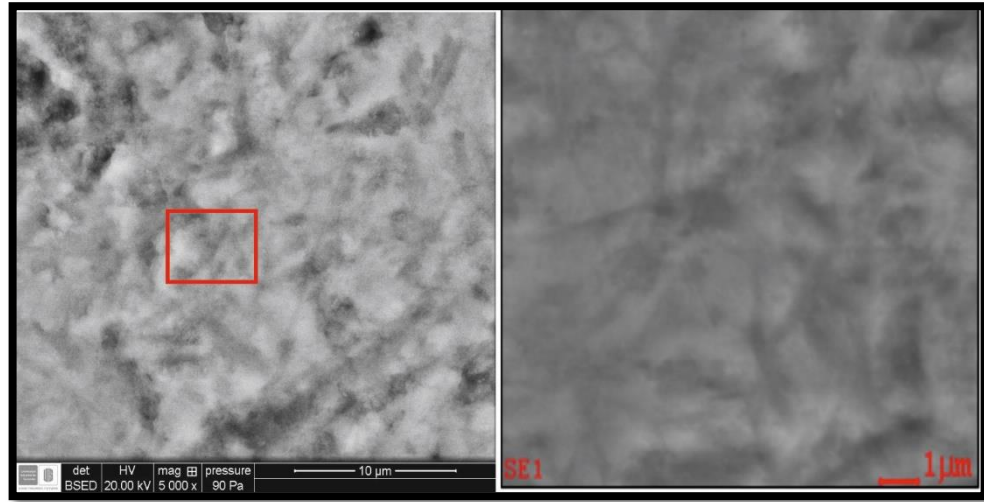


Figura 27. Imagen de electrones retrodispersados de la cubierta de Hierro del Bivalvo con su respectivo punto donde se realizó el análisis EDS.



Como se observa en los resultados (Figura 35) la cubierta posee un alto contenido de oxígeno, el cual se encuentra en compuestos de aluminosilicatos y óxidos de hierro, sin embargo se aprecia que el material es principalmente óxido de hierro, probablemente Hematite (Fe_2O_3).

Figura 28. Imagen de electrones retrodispersados con su respectivo espectro composicional de la cubierta de hierro del Bivalvo.

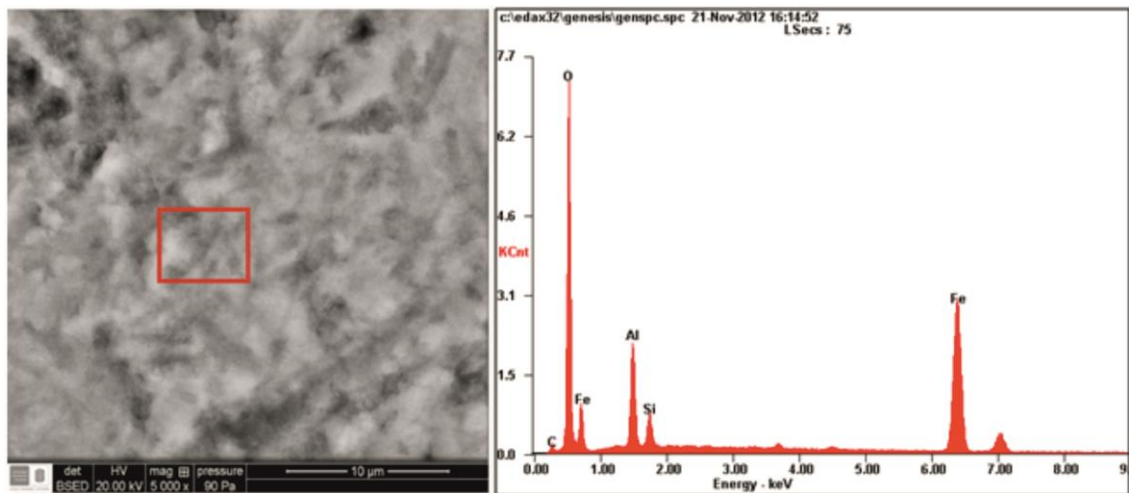
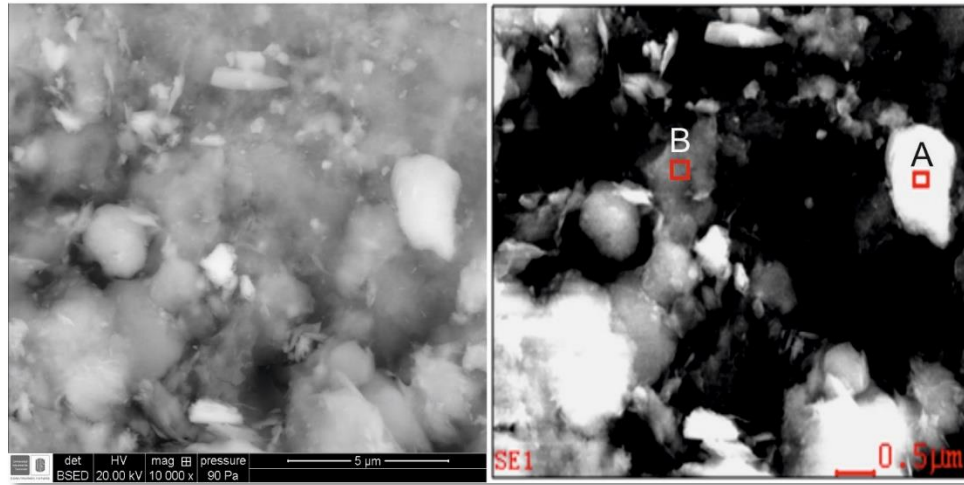
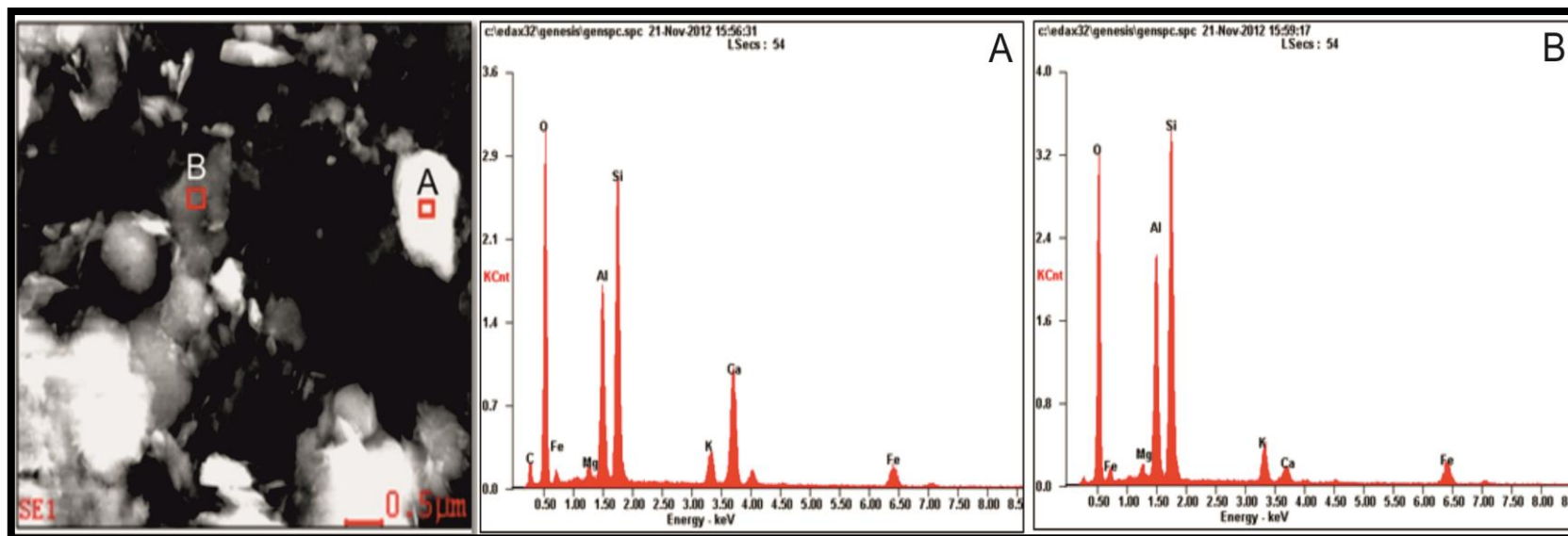


Figura 29. Imagen de electrones retrodispersados del relleno interno silíceo del Bivalvo, junto con los puntos que recibieron el análisis EDS.



Los resultados (Figura 37 y 38) muestran que los puntos están compuestos por Feldespatos Plagioclasa $Na(AlSi_3O_8)$, sin embargo se aprecia que el punto A (Figura 38) pertenece a un cristal de Plagioclasa Cálctica posiblemente a una Anortita ($CaAl_2Si_2O_8$), mientras que el punto B (Figura 38) demuestra que las cantidades de Calcio han descendido, por tanto debe de tratarse de una plagioclasa más sódica, como una Andesina $((Na, Ca)(Si, Al)_4O_8)$ u Oligoclasa $((Na, Ca)(Si, Al)_4O_8)$.

Figura 30. Imagen de electrones retrodispersados del relleno interno silíceo del Bivalvo. A. Espectro composicional del relleno del bivalvo en la región A. B. Espectro composicional del relleno del bivalvo en la región B.



6.4.2 Ejemplo Práctico 7: Meteorización en un Braquiópodo de la formación floresta

¿Cuál es la composición química del Braquiópodo con coloración anómala?

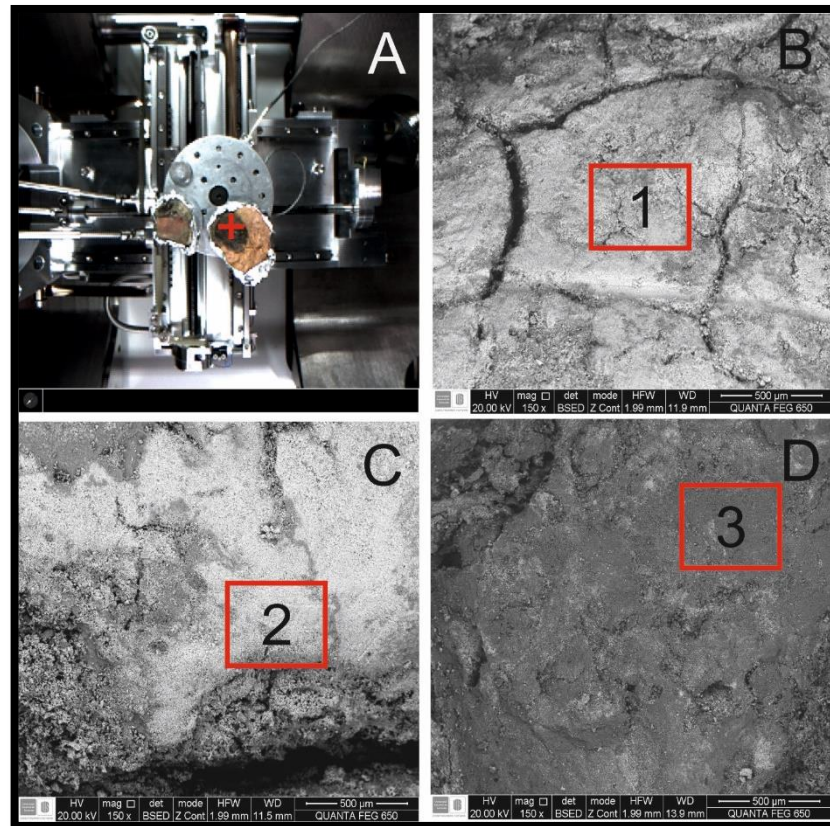
El braquiópodo corresponde a una muestra recolectada hacia la base de la formación Floresta, en un sitio aledaño del municipio de Floresta. La muestra fue escogida debido a que presentaba una coloración oscura inusual al tipo de roca en la que se encontraba y del resto de fósiles de la misma especie que se habían recolectados.

Figura 31. Braquiópodo en muestra de mano.



Se realizó el montaje y se registraron las imágenes de electrones retrodispersados a 150x, con las cuales se realizó un análisis EDS de composición.

Figura 32. Análisis EDS de la muestra de Braquiópodo. A. Imagen del montaje y punto a donde se realiza la toma de las imágenes de electrones retrodispersados. B. Imagen de electrones retrodispersados en la que se realiza el análisis EDS 1. C. Imagen de electrones retrodispersados en la que se realiza el análisis EDS 2. D. Imagen de electrones retrodispersados en la que se realiza el análisis EDS 3.



Como se puede observar en los resultados EDS (Figuras 41, 42 y 43) la composición química de la muestra es aluminosilicatada, sin embargo, no se puede omitir la presencia de hierro que en el punto 2 (Figura 42) se hace mayor, lo cual indica la presencia de óxidos debido a la meteorización. En conclusión, la muestra posee esa coloración oscura debido a los óxidos que se formaron por procesos de meteorización posteriores a la diagénesis del fósil.

Figura 33. Espectro composicional del braquiópodo en la región 1.

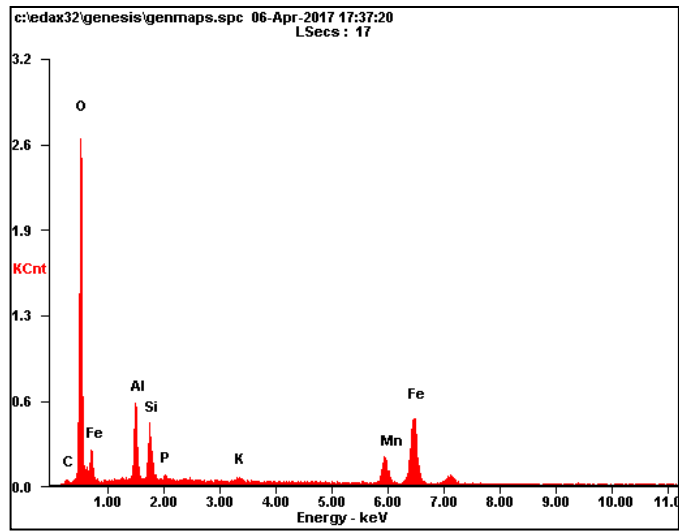


Figura 34. Espectro composicional del braquiópodo en la región 2.

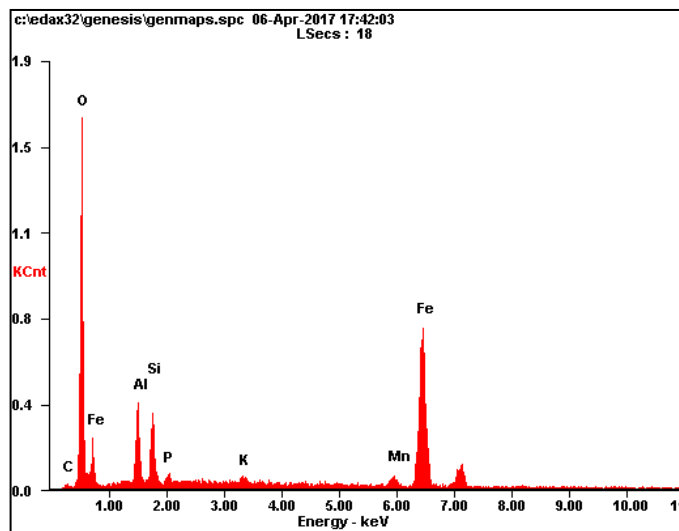
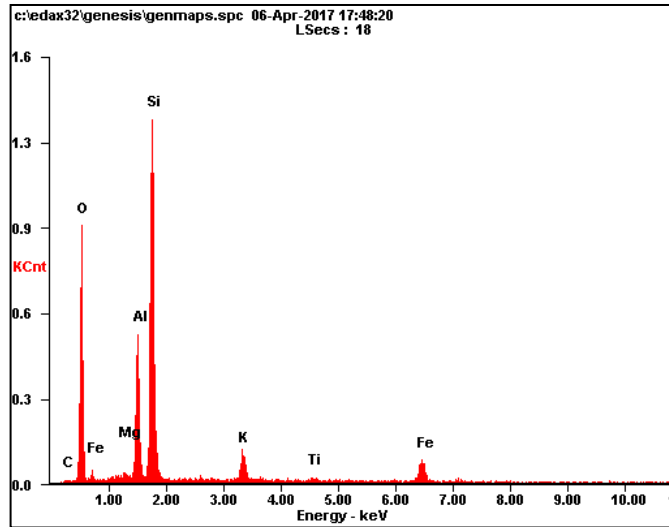


Figura 35. Espectro composicional del braquiópodo en la región 3.



6.5 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS Y EDS DE MUESTRAS ÓSEAS.

Aplicar la herramienta del microscopio electrónico de barrido en muestras óseas es complicado debido al tamaño, sin embargo, es posible realizar análisis a partir de muestras de menor tamaño, tales como dientes.

Pasos que deben ser seguidos:

1. Limpieza de la muestra con brochas o pinceles, se requiere que la superficie que se va a analizar este limpia.
2. Realizar el montaje en el Microscopio Electrónico de Barrido, es posible usar la técnica de bajo vacío como la de alto vacío (recomendable el alto vacío para la toma de imágenes en electrones secundarios).
3. Reconocer los rasgos morfológicos más representativos para su análisis
4. Tomar imágenes en electrones secundarios que representen los rasgos morfológicos que permitan su clasificación.

5. Escoger los puntos que muestren posibles cambios composicionales, como cambios de color y textura.
6. Tomar imágenes de Electrones Retrodispersados a diferentes magnificaciones.
7. Reconocer cambios texturales en las imágenes de Electrones Retrodispersados con el fin de reconocer los posibles cambios de composición.
8. Escoger los puntos y proceder al análisis composicional EDS.

Se realizaron análisis en el SEM de estas muestras usando el protocolo planteado anteriormente, los resultados de estos análisis se aprecian a continuación:

6.5.1 Ejemplo Práctico 8: Diente de Pliosauridae. Fue aplicado el protocolo planteado inicialmente en el cual se retiró el material particulado sobre la muestra, luego se realizó el montaje en la cámara de bajo vacío para la toma de imágenes en electrones secundarios y electrones retrodispersados.

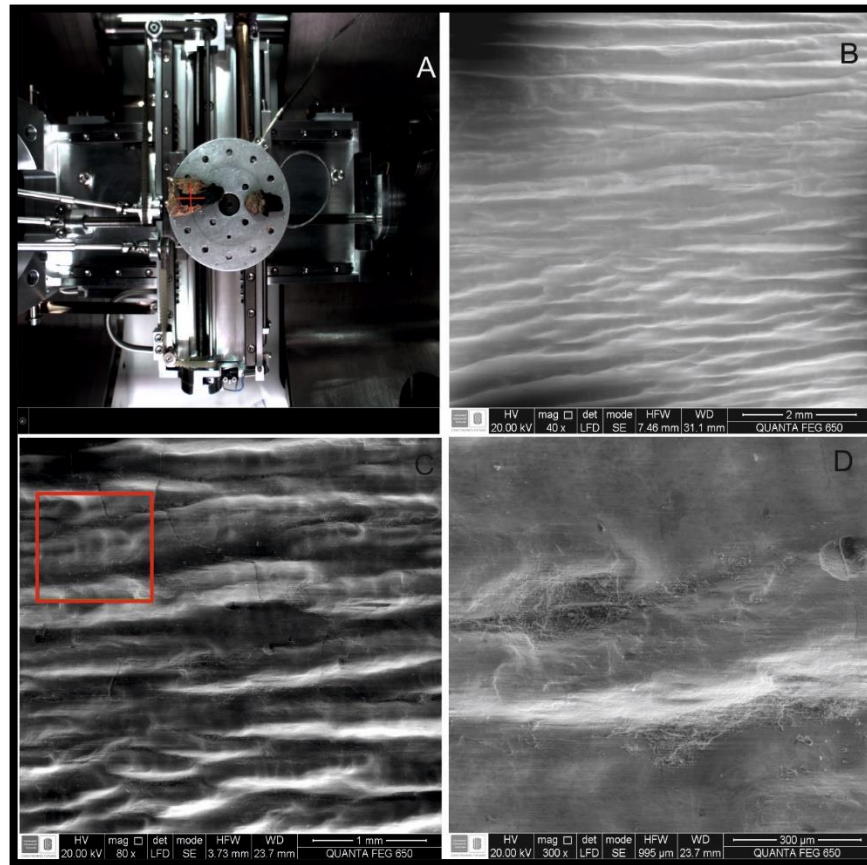
6.5.1.1 Análisis Morfológico

¿Qué rasgos morfológicos son observables que pueden ayudar en la identificación de la especie?

La muestra corresponde a un diente fósil encontrado en la formación Rosablanca, aflorante cerca al municipio de Zapatoca en la zona del cerro la vieja, esta fue recolectada por el estudiante autor del proyecto en conjunto con el profesor Javier Jerez en la salida de campo de Paleontología I.

En las imágenes de electrones secundarios (Figura 44) se logran observar las características de las estrías que presenta el diente, con estos datos se permite identificar que el diente fósil pertenecía a un reptil marino de la familia Pliosauridae.

Figura 36. Imágenes de electrones Secundarios del Diente del Pliosauridae. A. Posición del punto analizado en el Microscopio Electrónico de Barrido. B. Imagen de Electrones Secundarios del punto a 40X. C. Imagen de Electrones Secundarios a 80X. D. Imagen de Electrones secundarios a 300x.

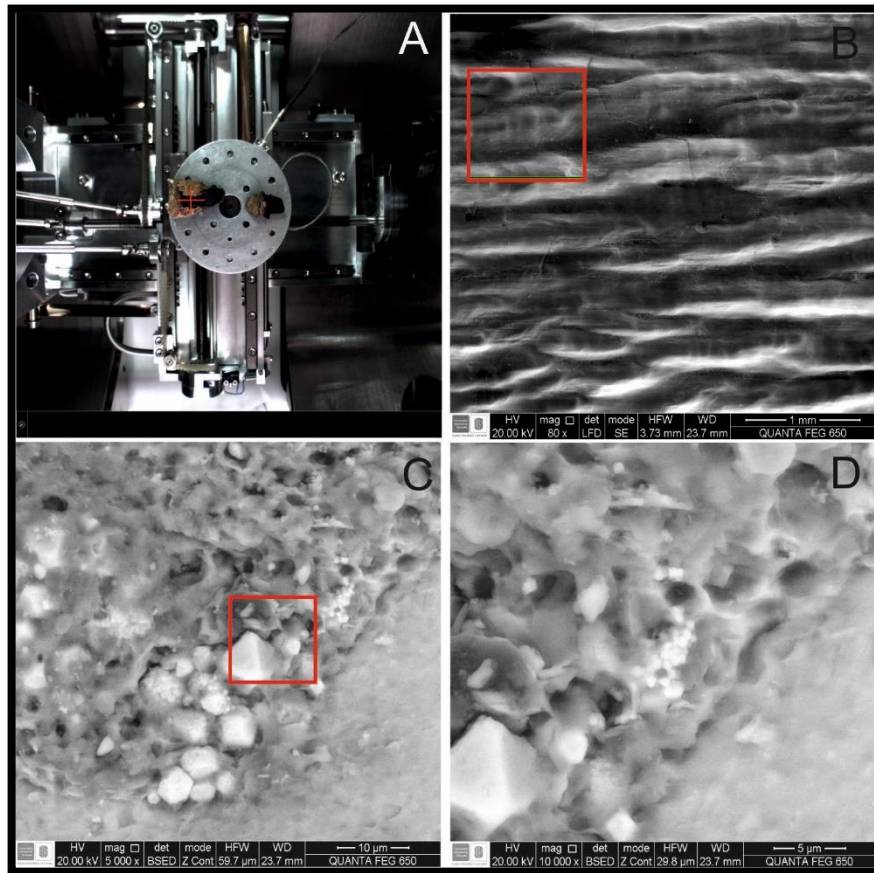


6.5.1.2 Análisis EDS

¿Cuál es la composición química del diente de Pliosauridae, sufrió reemplazamiento?

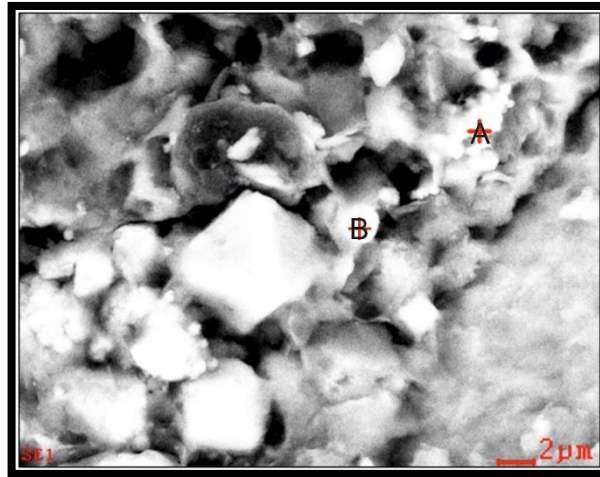
Para el análisis EDS se toman imágenes de electrones retrodispersados a 10000X para poder observar las estructuras micro cristalinas de los minerales que reemplazaron al diente durante su proceso diagenéticos de fosilización.

Figura 37. Imágenes tomadas para el análisis EDS del diente de Pliosauridae. A. Punto tomado del Diente para el análisis EDS. B. Imagen de Electrones Secundarios a 80x. C. Imagen de Electrones Retrodispersados a 5000X. D. Imagen de electrones retrodispersados usada para el análisis EDS a 10000x.



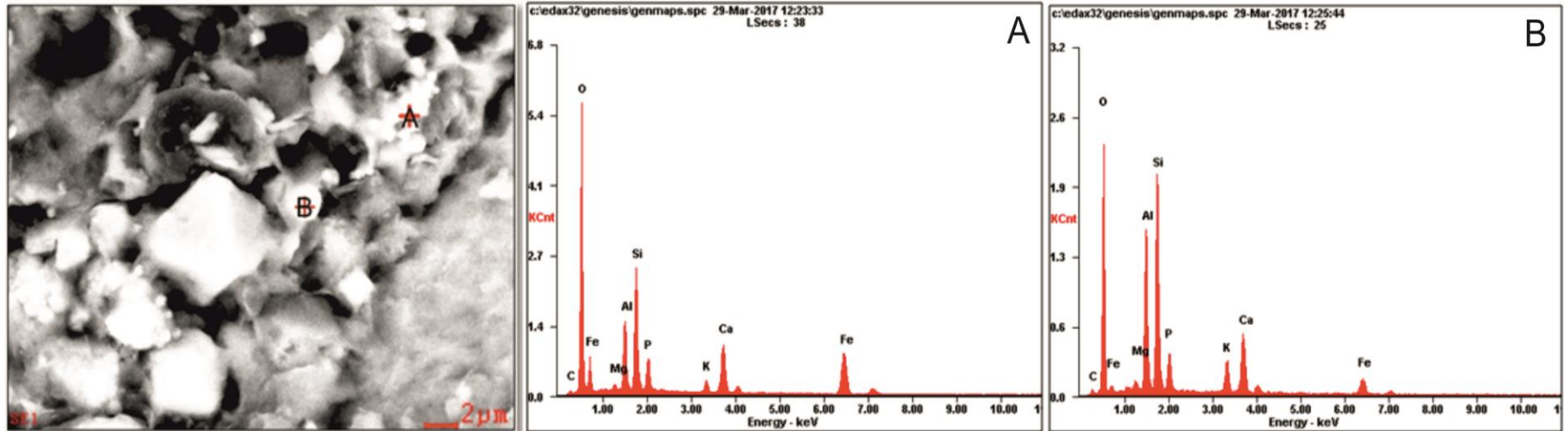
A partir de la imagen de electrones retrodispersados (Figura 45D) se realiza la selección de dos puntos para proceder con el análisis EDS.

Figura 38. Puntos Analizados con la técnica EDS del diente de Pliosauridae.



Los resultados (Figuras 47 y 48) muestran la presencia del elemento fósforo, por tanto, indica la presencia de minerales fosfáticos. Según la forma del cristal y los análisis EDS es posible asociar estos puntos al mineral Colofano ($Ca_5(PO_4)_3(F,Cl,OH)$) el cual a su vez es un derivado del mineral Apatito producto de procesos diagenéticos durante los procesos de fosilización.

Figura 39. Puntos Analizados con la técnica EDS del diente de Pliosauridae. A. Espectro composicional del diente de Pliosauridae en la Región A. B. Espectro composicional del diente de Pliosauridae en la Región B.



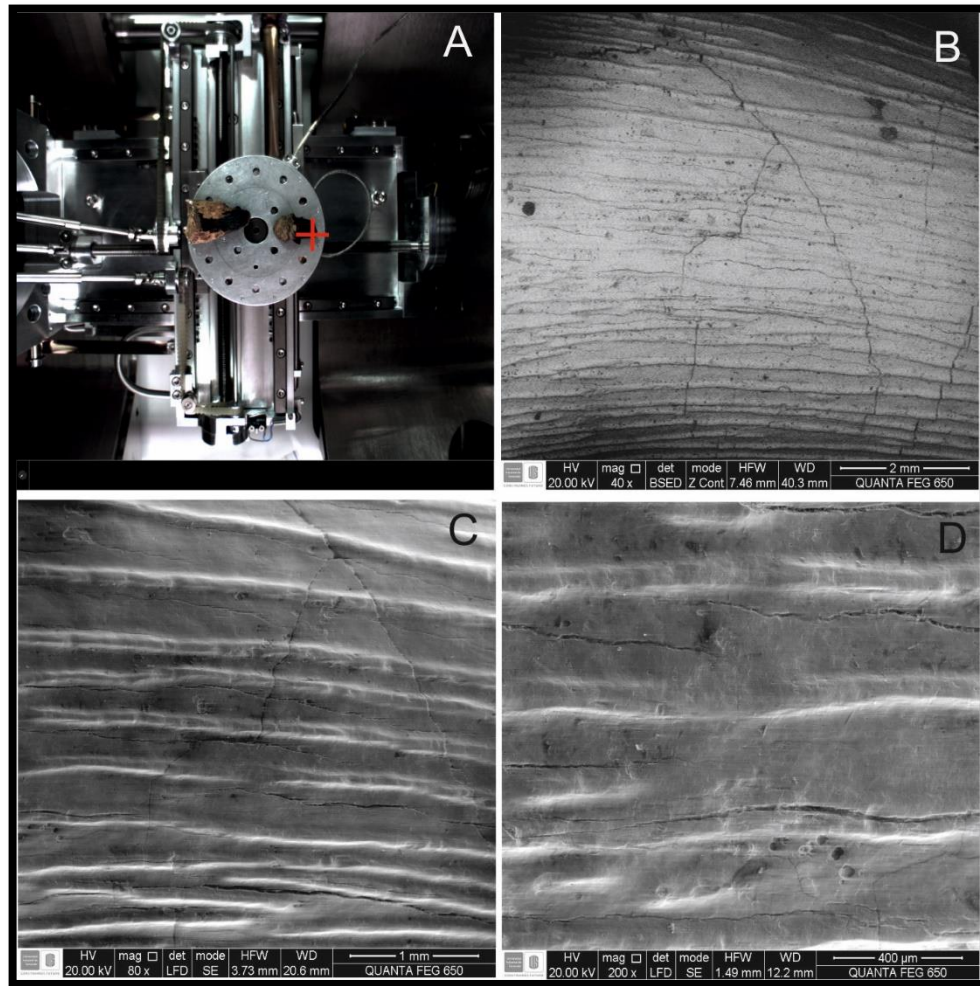
6.5.2 Ejemplo Práctico 9: Diente de Plesiosauridae. Para el análisis se procedió con el protocolo planteado anteriormente, primero se retiró toda impureza sobre la superficie de la muestra y luego se elaboró el montaje en la cámara de bajo vacío para la toma de las imágenes en electrones secundarios y en electrones retrodispersados

6.5.2.1 Análisis Morfológico

¿El diente corresponde a la misma familia del anterior reptil marino o pertenece a una diferente?

La muestra corresponde a un diente fósil encontrado a una distancia de aproximadamente 20 metros de diferencia con el diente anterior en la formación Rosablanca, cerca al municipio de Zapatoca en la zona del cerro la vieja. Esta muestra fue recolectada por el profesor Javier Jerez en la salida de campo de Paleontología I.

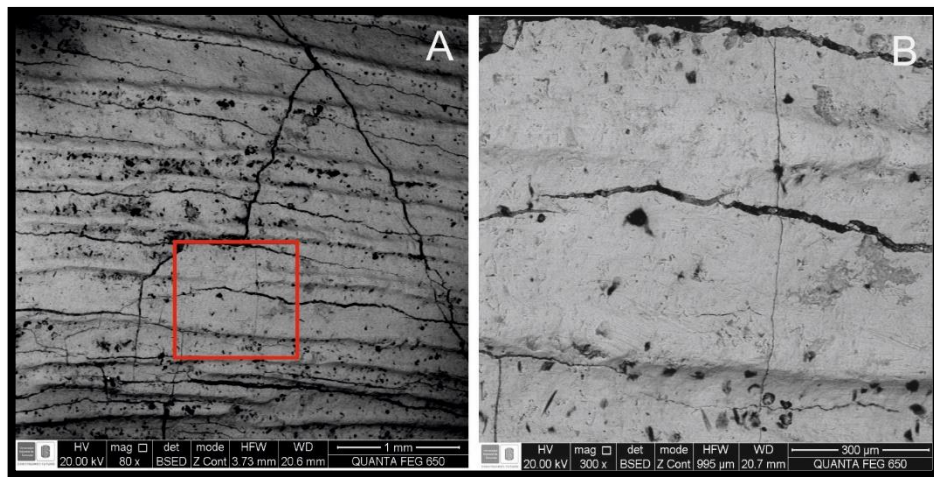
Figura 40. Imágenes de electrones Secundarios del Diente de Plesiosauridae. A. Posición del punto analizado en el Microscopio Electrónico de Barrido. B. Imagen en electrones retrodispersados a 40x. C. Imagen en electrones Secundarios a 80X. D. Imagen de electrones secundarios a 200x.



Las imágenes de Electrones Secundarios permiten reconocer la morfología del diente, siendo diferente al diente anterior, las estrías de este diente son menos profundas y tienden a ser continuas. Con ayuda del profesor Javier se logró identificar que el espécimen corresponde a la familia Plesiosauridae.

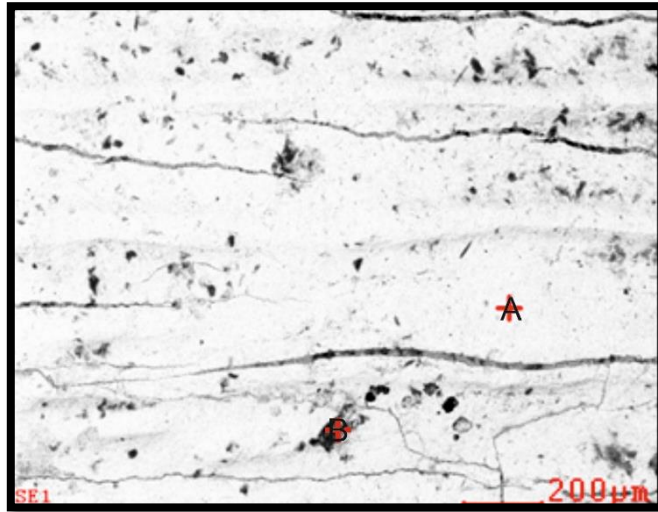
6.5.2.2 Análisis EDS: Los análisis EDS fueron tomados a partir de las imágenes de electrones retrodispersados en una magnificación de 200x debido a que a mayores magnificaciones no se lograba apreciar las microestructuras cristalinas, ya que el detector no lograba recibir apropiadamente la señal del haz de electrones por la baja conductividad del material.

Figura 41. Imágenes de Electrones Retrodispersados del diente de Plesiosauridae usados para el análisis EDS. A. Imagen de Electrones Retrodispersados a 80x. B. Imagen de Electrones Retrodispersados a 300x con la cual se realizó el análisis EDS.



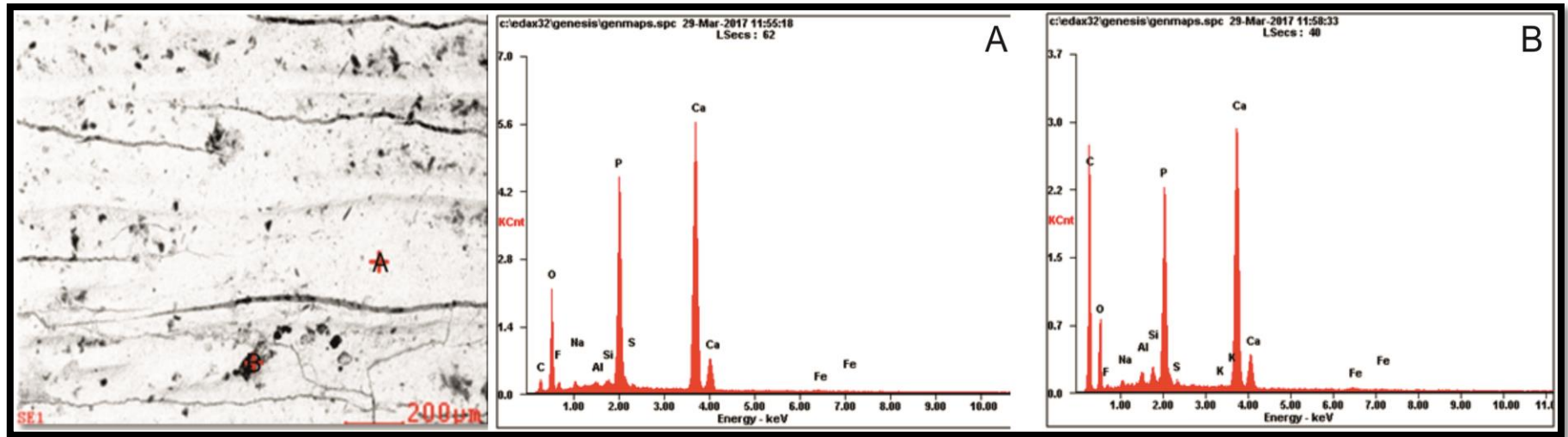
Se analizaron dos puntos de la imagen (Figura 50B) para conocer su composición a partir de un examen EDS.

Figura 42. Puntos Analizados con la técnica EDS del diente de Plesiosauridae.



Mientras que el diente Pliosauridae posee una composición química aluminosilicatada y fosfatada (Figuras 47 y 48) este diente está compuesto de minerales carbonatados, como se puede observar en los resultados del análisis EDS (Figuras 52 y 53).

Figura 43. Puntos Analizados con la técnica EDS. A. Espectro composicional del diente de Plesiosauridae en el punto A. B. Espectro composicional del diente de Plesiosauridae en el punto B.



6.5.3 Ejemplo Práctico 10: Diente de Pez Picnodontidae. El análisis se realizó con base al protocolo planteado anteriormente, se efectuó su respectiva limpieza de su superficie, luego se ejecutó el montaje en la cámara del microscopio electrónico de Barrido en condiciones de Alto Vacío para la obtención de imágenes en electrones secundarios en mejor resolución y por último se registraron las imágenes de electrones retrodispersados en las que se realizaron los análisis composicionales EDS.

La muestra fósil corresponde a un fragmento de diente de pez Picnodontidae recolectado por el profesor Javier Jerez, en la formación Rosablanca.

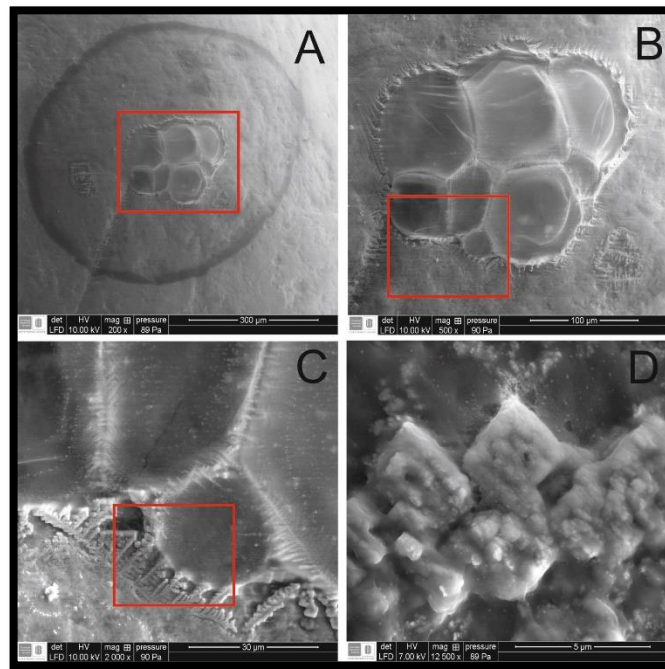
6.5.3.1 Análisis Morfológico

¿Cuál es la estructura microcristalina que forma el diente?

Se registraron las imágenes de electrones secundarios a diferentes magnificaciones hasta que se logró apreciar la distribución y la forma de los microcristales que componen la muestra fósil.

Los cristales que se encuentran formando al fósil presentan una morfología cubica con algunas formas de burbuja (Figura 54), aunque estas últimas corresponden a procesos de disolución del material calcáreo que compone la muestra. La figura 54A permite observar un plano general de la superficie del diente, resaltando una serie de anomalías en la zona central (Figura 54B). Se aprecian depósitos de minerales cúbicos en las grietas de las anomalías (Figuras 54C y 54D).

Figura 44. Imágenes en diferentes magnificaciones de electrones secundarios del Diente del Pez Picnodontidae. A. Imagen en SE a 200x. B. Imagen en SE a 500x. C. Imagen en SE a 2000x. D. Imagen en SE a 12500x.



6.5.3.2 Análisis EDS.

¿Los cristales bien definidos indican cambios en la composición química con respecto a las demás zonas de la muestra?

Para la toma de los puntos EDS se seleccionaron dos puntos en diferentes partes de la muestra, el primero corresponde a la zona donde se aprecian los cristales bien formados y el segundo corresponde a la zona central de la muestra.

Figura 45. Ubicación de los puntos EDS tomados del diente del pez Picnodontidae.

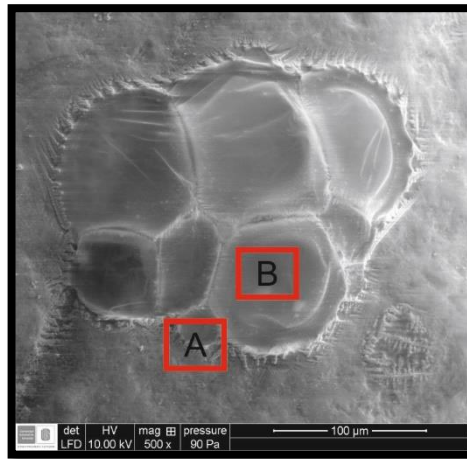
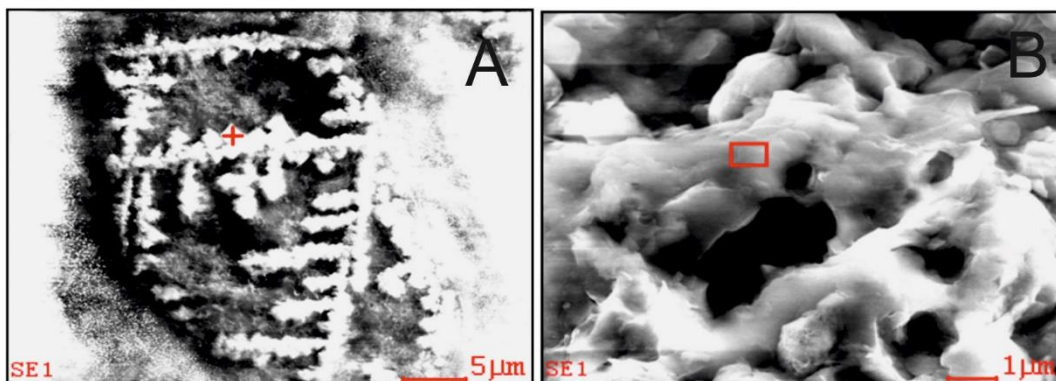


Figura 46. Imagen en electrones Retrodispersados con los puntos EDS analizados del diente del pez Picnodontidae. A. Imagen en electrones retrodispersados a 3000x. B. Imagen en electrones retrodispersados a 6000x.



Los resultados indican que los cristales que se encuentran bien definidos característicos de muestras de dientes y huesos, poseen una composición rica en Calcio (Ca), Potasio (K), Fósforo (P). La presencia de Cloro (Cl) en los cristales cúbicos se asocia con el mineral Halita (Figura 57). Mientras que el resto de la

muestra posee una composición química más aluminosilicatada con menores porcentajes de Calcio (Ca) (Figura 58).

Figura 47. Espectro composicional del diente en la región A.

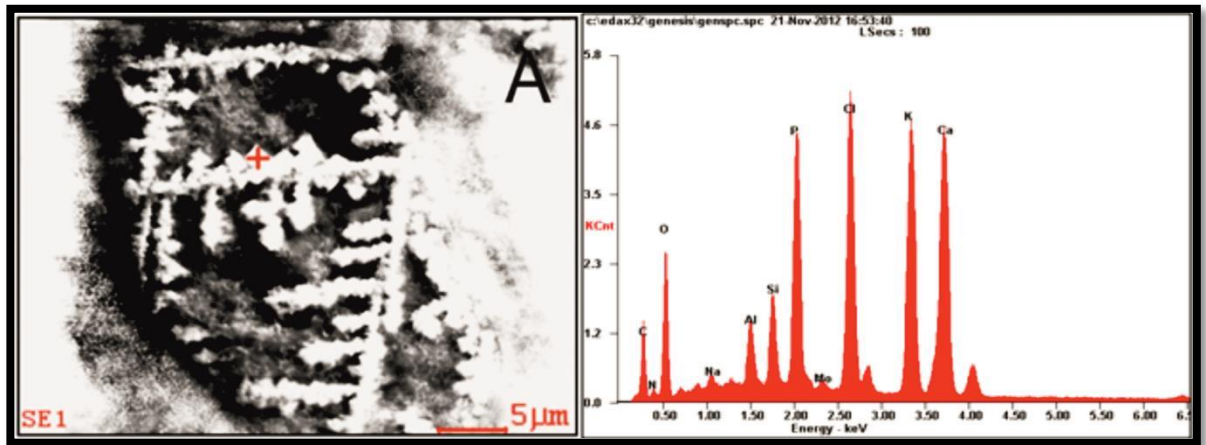
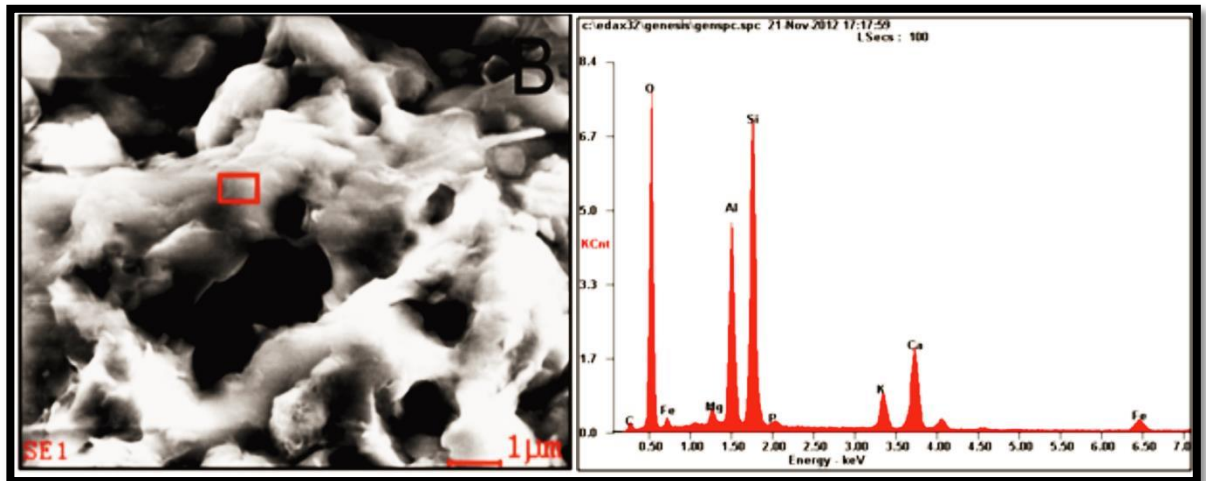


Figura 48. Espectro composicional del diente en la región B.



6.6 ANÁLISIS DE MAPEO ELEMENTAL

El análisis del mapeo elemental o Mapping, permite determinar la cantidad aproximada de un elemento químico distribuido espacialmente en la muestra, mediante un examen semicuantitativo. Se realiza un barrido textural de la muestra en donde se aprecian las diferentes intensidades del elemento de interés en la imagen. Esta técnica requiere de una muestra que posea una superficie que en su mayoría sea plana, necesariamente debe tener un recubrimiento para muestras no conductivas, el tiempo estimado puede variar de una a tres horas y esto depende del tamaño del detector que se posea, en el caso del equipo del laboratorio de Microscopia electrónica de la Universidad Industrial de Santander se requieren tres horas, ya que el detector EDS es pequeño.

Pasos a seguir:

1. Limpieza de la muestra con pinceles o brocha suave para eliminar partículas sueltas.
2. Muestras húmedas requieren secado en el horno por 10 Horas a 70-80 Grados Celsius.
3. Recubrir la muestra con un material conductor como grafito u oro, en la maquina evaporadora Quórum Q150R del laboratorio de Microscopia.
4. Realizar el montaje en el Microscopio Electrónico de Barrido en condiciones de Alto Vacío.
5. Búsqueda de los lugares de interés de la muestra.
6. Tomar de imágenes con electrones retrodispersados.
7. Iniciar el análisis de mapeo elemental, esto tomará entre una y tres horas.
8. Interpretación de las imágenes de distribución y concentración del o los elementos de interés.

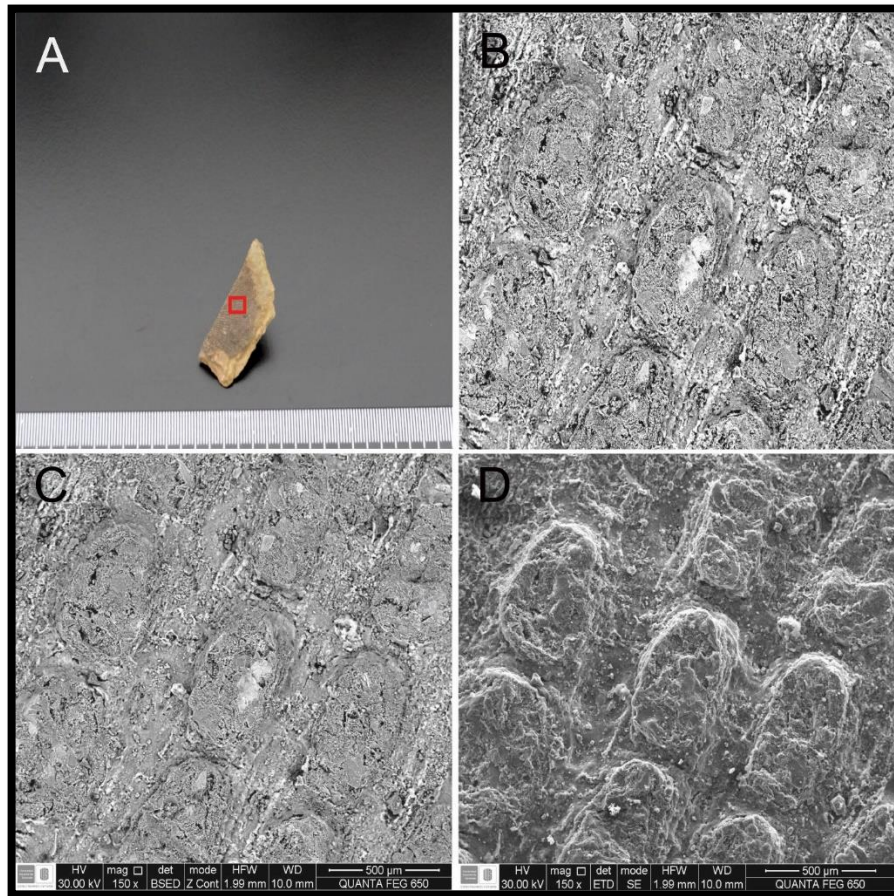
Mediante el siguiente ejemplo se aprecia cómo fue puesto en práctica el protocolo planteado anteriormente:

6.6.1 Ejemplo Práctico 11: Mapeo Elemental de un zoario del Briozoo *Fenestella harrisi* del Devónico temprano. La muestra fue recolectada de la base de la Formación Floresta, yacimiento Monticelo. Desde el punto de vista de la fosilización corresponde con el fragmento de un zoario que ha sido reemplazado por aluminosilicatos (feldespatos). El espécimen se seleccionó para este procedimiento debido a la forma plana en que se dispone sobre la roca que facilita los resultados e interpretación de este tipo de análisis.

¿Fue la diagénesis igual en los zoecios como en las fenestrulas de *Fenestella harrisi*?

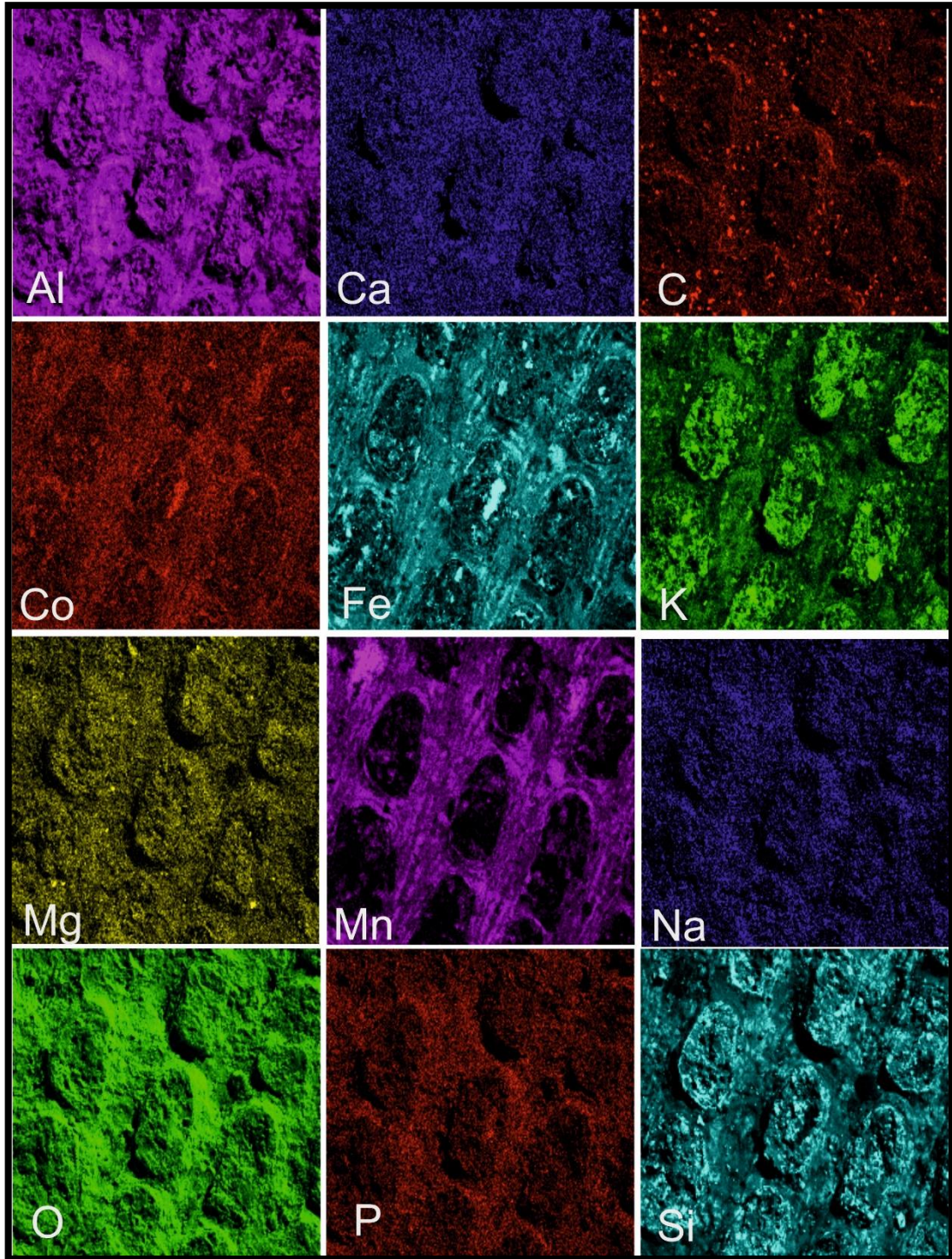
Para llevar a cabo este análisis se debe seguir el protocolo propuesto, iniciando con la limpieza de la muestra, el secado y el cubrimiento. Luego se monta en el microscopio electrónico de Barrido en condiciones de alto vacío y se procede a realizar las fotografías de alta resolución y el análisis de mapeo.

Figura 49. Mapeo elemental del Briozoo *Fenestella harrisi*. A. Muestra de Mano. B. Primer análisis de mapeo mediante una imagen de electrones secundarios. C. Imagen de electrones retrodispersados usada en el Mapeo Elemental. D. Imagen de electrones Secundarios del segmento analizado.



El análisis generó una serie de mapas texturales (Figura 61) para cada elemento detectado en la muestra. Las regiones con mayor brillo se correlacionan con una mayor concentración del elemento. Se puede observar que el relleno de las fenestrulas es rico en Si, Al, K, Ca, Mg, O y Na y pobre en Mn, P, Fe y C que es más abundante en la estructura de los zoarios. Estos resultados indican dos tipos de procesos sobre el fósil, uno que lo afectó directamente y otro que aporta información sobre el proceso de relleno de las fenestrulas.

Figura 50. Mapas texturales de *Fenestella harrisi* para cada elemento analizado.



7. PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE ESPECÍMENES FÓSILES POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

7.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Inicialmente se requiere que la muestra se encuentre libre de impurezas en la superficie que se pretende analizar, con el objetivo de obtener datos precisos, en este paso se realiza mediante la limpieza con brochas o pinceles
- El siguiente paso consiste en el secado de la muestra, debido a que si la muestra posee humedad esta producirá interferencia con el haz incidente, por consiguiente, las imágenes resultantes serán de baja calidad. La eliminación de la humedad se realiza en una mufla o en un horno en un tiempo de 10 horas con temperaturas entre 70-80 grados Celsius.
- Realizar el recubrimiento de la muestra con grafito u oro, debido a que la mayoría de las rocas poseen superficies no conductoras y esto afecta la resolución de las imágenes de electrones secundarios. Este paso se realiza en la maquina evaporadora Quórum Q150R del laboratorio de Microscopia

7.2 ANÁLISIS EN EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.

- Realizar el montaje en el Microscopio Electrónico de Barrido. En este paso se escogerá el tipo de condiciones en la que se pretenda trabajar. El microscopio ofrece condiciones en Alto Vacío, la cual permite una mejor calidad en la toma

de imágenes en electrones secundarios. Las condiciones de Bajo Vacío permiten el análisis EDS en menor tiempo.

- Tomar imágenes en electrones secundarios (SE), este paso es necesario debido a que estas imágenes permiten un conocimiento de la profundidad de la muestra mediante la diferenciación del sombreado. Estas son requeridas si se desea realizar un análisis morfológico de la muestra.
- Tomar imágenes de electrones retrodispersados (EDX), la importancia de estas imágenes radica en el reconocimiento de los cambios texturales, los cuales son el criterio para escoger los puntos a los que se les realiza el análisis de composición EDS.

7.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

- A partir de las imágenes de electrones secundarios (SE) se reconocen los rasgos morfológicos característicos de la muestra analizada con el objetivo de determinar patrones morfológicos para estudios sistemáticos, ecológicos y/o diagenéticos.
- Con base en los resultados EDS obtenidos de las imágenes de electrones retrodispersados (EDX), se procede la clasificación de los minerales que componen la muestra fósil.

8. DISCUSIÓN

A partir de los análisis que se realizaron en el desarrollo de este trabajo se lograron elaborar una serie de protocolos aplicados a muestras fósiles en el microscopio electrónico de Barrido, según los resultados obtenidos se observan que para muestras de origen arcilloso es necesario usar un recubrimiento de grafito en la toma de imágenes de electrones secundarios (SE), debido a que se requiere que el rayo de electrones incidentes interactúe con la superficie de la muestra²¹ y en el material arcilloso esto no ocurre, resultando que las imágenes salgan de una forma borrosa (Ver Anexo B). Por otra parte, se conoce que las muestras de material arcilloso que son analizadas en el Microscopio Electrónico de Barrido sin ser recubiertas no podrán generar imágenes claras en aumentos de mayores a 5000x²².

Los resultados EDS permitieron conocer las composiciones químicas del material analizado, sin embargo, no se apreció que para estos análisis sea totalmente necesario el uso del recubrimiento, debido a que los resultados obtenidos para la misma muestra con recubrimiento y sin recubrimiento fueron bastante parecidos con la gran diferencia de la presencia de Carbono en la muestra que fue recubierta (Ver Anexo B).

Durante el desarrollo del Protocolo para análisis morfológicos y EDS de muestras Óseas (Ver Anexos C). Las muestras de dientes de Plesiosaurios sin recubrimiento de grafito no presentaron inconvenientes en el registro de las imágenes, de igual forma para el análisis del diente de del pez Picnodontidae. Por lo tanto, se tiene que el uso del recubrimiento depende del tamaño de la magnificación que se quiere analizar.

²¹ SEVERIN, Op. Cit.

²² BOHOR, B., HUGHES, R., "Scanning Electron Microscopy of clay and clay minerals". 1970..

Los análisis de composición química EDS permiten conocer la composición actual del material fósil como resultados de su diagénesis, sin embargo, los análisis EDS no son suficientes por lo que es necesario realizar estudios de sedimentología, icnología, estratigrafía y bioestratinomia los cuales permiten entender detalladamente la inferencia de los ambientes de deposición en relación con los procesos de preservación que afectaron la muestra fósil.²³

Se establece que todos los protocolos planteados posean en común la deshidratación de la muestra fósil antes de su análisis para la obtención de una mayor resolución en las imágenes y los análisis (Ver Anexo B).

²³ WEBSTER, GAINES, HUGHES, Op. Cit.

9. CONCLUSIONES

- Se determinó mediante las pruebas en el laboratorio de microscopia Electrónica de Barrido, que las muestras requieren de estar libre de humedad y poseer una superficie libre de impurezas para que de esa forma sea posible el registro de imágenes en electrones secundarios y retrodispersados a altas resoluciones.
- Para los análisis de morfología se debe tener presente los tamaños de la muestra fósil, debido a que si se pretende analizar un fósil de un tamaño menor a 1 cm es requerido utilizar la técnica de alto vacío y un recubrimiento de grafito, para que el registro de imágenes en electrones secundarios sea en una alta resolución.
- Luego de completar las pruebas de laboratorio se llega a la conclusión que los análisis de morfología si bien pueden hacerse a condiciones de bajo vacío y sin recubrimiento, es recomendable que sea usada una película de recubrimiento y que se analicen en condiciones de alto vacío para obtener imágenes con mejores detalles.
- El análisis de composición EDS es una herramienta muy eficiente para realizar estudios de procesos diagenéticos en una muestra fósil, dado que las imágenes pueden ser tomadas a diferentes magnificaciones con alta resolución tanto con recubrimiento o carencia de este, igualmente puede usarse las técnicas de alto como de bajo vacío, de manera que para la toma de estos análisis solo se requiere el secado y limpieza de la muestra.
- Los resultados obtenidos mediante los análisis EDS permitieron conocer las composiciones químicas y mineralógicas de las muestras fósiles, con base a esto se reconoció la importancia de los procesos diagenéticos de fosilización

como la silicificación y la carbonatación, debido a que los fósiles presentaban la composición química dependiendo del tipo de roca en que se encontraban.

- El microscopio electrónico de Barrido es una herramienta que permite complementar estudios en el área de la paleontología, debido a que se pueden realizar análisis de morfología en muestras fósiles de tamaños pequeños y a la importancia de los análisis composicionales EDS, para conocer sus procesos tafonómicos.
- Los análisis EDS otorgan información sobre la composición actual del fósil, sin embargo, para realizar un estudio detallado sobre los procesos tafonómicos es necesario la aplicación de otros estudios.
- Con base al protocolo de análisis de mapeo elemental se llega a la conclusión de que es una técnica poco convencional y con un rango bajo de aplicaciones, debido a que sus resultados se interpretan mediante rasgos texturales y no cuantitativos.

BIBLIOGRAFÍA

AUSICH, W., BABCOCK, L., “Echmatocrinus, a Burgess Shale animal reconsidered.” *Lethaia Seminar Lethaia*, Vol. 33, pp. 92±94. Oslo, 2000.

ANH. “Cartografía geológica cuenca cordillera oriental – sector Soapaga”. 2006

BOHOR, B., HUGHES, R., “Scanning Electron Microscopy of clay and clay minerals”. 1970. Illinois State Geological Survey, Natural Resources Building, Urbana, Ill. 61801

BEDOYA, C., NOMESQUI, H., “Estratigrafía y Petrografía de la formación Rosablanca: implicaciones para la identificación de eventos anóxicos oceánicos en la cordillera oriental colombiana”. 2013

CATHEY, D, “Low Vacuum SEM Imaging of Bivalve Internal Shell Structure Under Alternate Sectioning Regimes”, Scanning Electron Microscopy Course Project, Primavera, 2009

CRUZ, L. JEREZ-JAIMES, J.H.” caracterización físico química, tafonomía y ecología de *orthokarstenia ewaldi* (foraminífera: siphogenerinoididae) de la formación los pinos (cretácico: maastrichtiano) de samacá (boyacá, Colombia). 2011. *Boletín de Geología* Vol. 33, N° 2.

FERRARI, S., BESSONE, S., “A new Early Jurassic marine locality from southwestern Chubut Basin, Argentina”. *Andean Geology*, Vol 42 P.P, 349-363, Septiembre, 2015.

FERNANDEZ, Y., MARÍN, M., “Experimental taphonomy in museums: Preparation protocols for skeletons and fossil vertebrates under the scanning electron microscopy”. 2008. *Geobios* 41 (2008) 157–181.

GOODGE, J., “Element Mapping” [En Línea]. 2015. Disponible en Internet: https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/elementmapping.htm

|

GOLDSTEIN J., NEWBURY D., ECHLIN P., JOY D. 1992. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. Segunda Edición.

JEREZ-JAIMES, J.H., CETINA-TARAZONA, M.A., y ARAQUE-GÓMEZ, C. N. 2013. Primer Registro del Briozoo *Stomatopora* aff. *cunningtoni* (Orden: Cyclostomata, Familia. Stomatoporidae) en el Cretácico Inferior de Colombia. *Boletín de Geología*, 35(2): 45-51. Mc Graw, H. “Principios de Análisis Instrumental”, Madrid, 2002.

JEREZ-JAIMES, J.H., CRUZ-GUEVARA, L.E., PINZÓN-GÓMEZ, R., y PORRAS-MONTERO, J.R. 2014. Primer Registro de *Serratolamna serrata* (Agassiz) (Pisces

MEJÍA-FALLA, P.A., RAMÍREZ, V. y NAVIA, A.F.. *Neoselachii*) del Maastrichtiano (Cretácico Superior) en Colombia. (Eds.) 2014. Libro de Resúmenes IV Encuentro colombiano sobre condriactos. Fundación SQUALUS, Cali. pp.70.

MORZADÉC, P., MERCH, M., VILLARROEL, C., JANVIER, P., RACHEBOEUF, P., “Trilobites and inarticulate brachiopods from the Devonian Floresta of Formation Floresta: a review,” *Bulletin of Geosciences* 90(2), 331–358, Marzo 23, 2015.

NIETO, M. "Fundamentos en la preparación de muestras para microscopia electrónica de barrido." [En Línea]. 2010. Disponible en Internet: aboratorios.tap-ecosur.edu.mx/LMEB/APUNTES%20MEB%20CURSO%202010.pdf.

ORR, P., BRIGGS, D., KEARNS, S., "Cambrian Burgess Shale Animals Replicated in Clay Minerals," *Science*: Vol. 281, Issue 5380, pp. 1173-1175, 21 Aug 1998.

PATARROYO-CAMARGO, German David; PATARROYO, Pedro; SÁNCHEZ-QUIÑÓNEZ, Carlos Alberto. 2009. Foraminíferos bentónicos en el Barremiano inferior de la Formación Paja (Boyacá-Santander, Colombia): Evidencias preliminares de un posible bioevento. *Geología Colombiana*, 34:111-122.

REED, J. 2005. *Electron Microprobe Analysis and Scanning Electron Microscopy in Geology*. Segunda Edición.

SEVERIN, K., "Energy Dispersive Spectrometry of Common Rocks Forming Minerals" Department of Geology and Geophysics, University of Alaska Fairbanks, U.S.A, 2004.

SORRIVAS, V., YAÑEZ, M., ALFONSINA MORALES, "Principios y Practica de la Microscopio Electrónica", 2014.

SZREK P., SALWA S. y NIDWIEDZK G., "A glimpse of a fish face — An exceptional fish feeding trace fossil from the Lower Devonian of the Holy Cross Mountains, Poland". 2016. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 454 (2016) 113–124.

TAFFOREAU, P., BOISTEL, R., BOLLER, E., BRAVIN, A. "Applications of X-ray synchrotron microtomography for non-destructive 3D studies of paleontological specimen". 2006. Applied Physics A. May 2006, Volume 83, Issue 2, pp 195–202

TAYLOR, P, "Scanning Electron Microscopy of Uncoated Fossils", Department of Paleontology, British Museum (Natural History), 1985.

UNIVERSITY OF EXETER, "Geochemical, sedimentological and mineralogical analysis, Low Vacuum SEM", 2015.

WEBSTER, M., GAINES, R., HUGHES, N., "Microstratigraphy, trilobite biostratigraphy, and depositional environment of the "Lower Cambrian" Ruin Wash Lagerstätte, Pioche Formation, Nevada". 2008. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 264 (2008) 100–122.

XU, J., LI, Y. An SEM study of microfossils in the black shale of the Lower Cambrian Niutitang Formation, Southwest China: Implications for the polymetallic sulfide mineralization", 2014. Ore Geology Reviews 65 (2015) 811–820

.