



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

NAIARA CIPRIANO OLIVEIRA

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CAMPO AMPLO
E MAPEAMENTO ELEMENTAR DE RAIOS-X DE FÓSSEIS DO
PERÍODO CRETÁCEO

FORTALEZA

2015

NAIARA CIPRIANO OLIVEIRA

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CAMPO AMPLO E
MAPEAMENTO ELEMENTAR DE RAIOS-X DE FÓSSEIS DO PERÍODO
CRETÁCEO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Física. Área de Concentração: Física da Matéria Condensada.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula.

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Gomes de Souza Filho.

FORTALEZA
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Física

-
- O48m Oliveira, Naiara Cipriano
Microscopia eletrônica de varredura de campo amplo e mapeamento elementar de raios-X de fósseis do período cretáceo / Naiara Cipriano Oliveira. – Fortaleza, 2015.
60 f.: il. color. enc.; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula.
Coorientação: Prof. Dr. Antônio Gomes de Souza Filho.
Área de concentração: Física da Matéria Condensada.
Inclui bibliografia.
1. Microscopia eletrônica de varredura. 2. Fóssil de camarão. 3. Imagens de campo amplo.
4. Mapas elementares. 5. Processo de fossilização. I. Paula, Amauri Jardim de. II. Souza Filho, Antônio Gomes de. III. Título.

NAIARA CIPRIANO OLIVEIRA

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CAMPO AMPLO E
MAPEAMENTO ELEMENTAR DE RAIOS-X DE FÓSSEIS DO PERÍODO
CRETÁCEO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Física. Área de Concentração: Física da Matéria Condensada.

Aprovada em 04/08/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Josué Mendes Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bartolomeu Cruz Viana Neto
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

*Dedico este trabalho
a Deus e a minha
mãe por ser a minha
inspiração de vida.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Deus pelo dom da vida que me concebeu e por ter iluminado meu caminho durante todos esses anos, me dando as forças necessárias na busca pelos meus objetivos.

A minha mãe Diomar Cipriano e a minha Tia Francisca Maria por todos os ensinamentos, amor, compreensão, paciência, atenção e principalmente pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis, pois sem elas ao meu lado a vitória não teria brilho.

Agradeço ao meu irmão José Filho *in memoriam*, que partiu de maneira repentina deixando uma vazia que jamais será preenchido em nossos corações. Um ser humano bom que me ensinou o valor da vida, a você meu irmão, meu muito obrigada!

Ao professor orientador, Dr. Amauri Jardim de Paula, pelo incentivo, pelas ideias, pela paciência, ajuda e aconselhamento no decorrer da realização da minha dissertação, e pela amizade.

Ao professor coorientador, Dr. Antônio Gomes de Souza Filho, pelo apoio, pelos incentivos, pela amizade e principalmente pelas oportunidades que foram criadas.

Um agradecimento especial aos professores, Dr. Humberto Carmona, Dr. Raimundo Nogueira, Dr. Josué Mendes, Dr. Murilo Pereira e Dr. Geová Maciel, que de uma forma ou de outra contribuíram para o meu aprendizado no decorrer desta importante etapa da minha vida.

Agradeço ao Laboratório de Paleontologia da Universidade Regional do Cariri (URCA) - LPU pelo fornecimento da amostra do fóssil analisado no presente trabalho.

Um agradecimento especial aos professores, Dr. João Hermínio, Dr. Antônio Álamo, Dr. Odair Ferreira, Dr. Paulo de Tarso, Dr. Allysson Pinheiro, Dr. William Santana, e a mestre Olga Barros, pela colaboração nas análises do fóssil.

A todos os colegas e amigos da Universidade Federal do Ceará - UFC, pela cumplicidade, amizade, apoio e por fazerem parte da minha vida, em particular Fellipe Campelo, Rivânia Texeira, Francisco Emmanoel, Márcio Melo e Samuel Moraes.

A minha amiga Fabrícia Almeida, pela cumplicidade, amizade, compreensão, carinho e pelo exemplo de determinação nos momentos de maior desespero e fraqueza.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos um muito obrigada!

RESUMO

Neste trabalho, apresenta-se uma abordagem de microscopia eletrônica de varredura aplicada em um fóssil de camarão do período Cretáceo (com uma área de aproximadamente 280 mm²) recolhido na Formação Ipubi, da Bacia Sedimentar do Araripe, Brasil. Tal abordagem conta com a detecção de sinais de elétrons retroespalhados (BSE) e de raios-X (emitidos a partir do processo de ionização do espécimen) formando micrografias eletrônicas de campo amplo. A alta definição das imagens de campo amplo de BSE e de raios-X é obtida a partir da sobreposição coerente de milhares de imagens adjacentes obtidas durante o procedimento de varredura de toda a área do fóssil. Através da interpretação dessas imagens foi possível desvendar detalhes da morfologia do fóssil imperceptíveis pela microscopia ótica, assim como características composicionais do material fossilizado ao longo de escalas de comprimento que variam de micrômetros a centímetros. Detalhes morfológicos dos pleópodos, pereiópodos, antenas, antênulas e somitos do camarão foram melhor visualizados nas imagens de campo amplo por BSEs, e também nos mapas elementares de campo amplo do cálcio (Ca) e do fósforo (P) (mineralizados como hidroxiapatita no fóssil, $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$). Além disso, os mapas elementares de campo amplo dos elementos fósforo (P) e flúor (F) apresentaram uma correlação entre si, indicando ao início da mineralização da fluorapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}]$, processo de fossilização que pode ser responsável pela preservação do fóssil. Outra informação importante, obtida pela correlação dos mapas elementares do zinco (Zn) e do enxofre (S), indicaram um processo de fossilização bastante raro, a mineralização por sulfeto de zinco (ZnS), observada pela primeira vez na Bacia Sedimentar do Araripe.

Palavras-chave: Microscopia Eletrônica de Varredura. Fóssil de Camarão. Imagens de Campo Amplo. Mapas Elementares. Processo de Fossilização.

ABSTRACT

In this work it is presented a scanning electron microscopy approach applied to a shrimp fossil from the Cretaceous period (with an area of approximately 280 mm²), collected in the Ipubi Formation, in the Araripe Sedimentary Basin, Brazil. This approach relies on the detection of signals of backscattered electrons (BSE) and X-rays (emitted from the ionization process) generated in a large-field scanning. High-definition large-field images from BSE and X-rays are obtained from the coherent overlapping of thousand of adjacent images obtained during the scan of the whole area of the fossil. Through the interpretation of those images it was possible to unveil details of the morphology of the fossil that are imperceptible by light microscopy, as well as compositional features of the fossilized material along length scales that varied from micrometers to centimeters. Morphological details of pleopods, pereopods, antennas, antennules and somites of the shrimp were better visualized in the large-field images from BSEs, and also in the large-field elemental maps for calcium (Ca) and phosphorus (P) (mineralized as hydroxyapatite [Ca₅(PO₄)₃OH]). Furthermore, the large-field elemental maps of phosphorus (P) and fluorine (F) presented a correlation, indicating the mineralization of the fluorapatite [Ca₅(PO₄)₃F], a fossilization process that is responsible for the preservation of the fossil. Other important information, obtained by correlating the elemental maps of zinc (Zn) and sulphur (S) indicated a very rare fossilization process, the mineralization of the zinc sulphide (ZnS), observed for the first time in the Araripe Sedimentary Basin.

Keywords: Scanning Electron Microscopy. Shrimp Fossil. Large-Field Images. Elemental Maps. Fossilization Process.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Elementos químicos identificados por meio dos espectros acumulativos de EDS, obtidos durante a varredura de campo amplo de toda área do material fossilizado.	47
Tabela 2 – Elementos químicos identificados por meio dos espectros de EDS de regiões específicas do fóssil (ver Figura 23), caracterizados de acordo com as regiões A, B e C.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alguns exemplares da riqueza fossilífera da Bacia Sedimentar do Araripe (Formação Santana).	14
Figura 2 – Localização da Bacia Sedimentar do Araripe.	15
Figura 3 – Unidades geológicas da Bacia Sedimentar do Araripe.	16
Figura 4 – Tipos de espalhamento.	22
Figura 5 – Interação elétron-matéria.	23
Figura 6 – Volume de interação elétron-matéria.	24
Figura 7 – Micrografias geradas por elétrons secundários.	25
Figura 8 – Micrografias geradas por elétrons retroespalhados.	26
Figura 9 – Exemplificação de um espectro de EDS.	27
Figura 10 – Diagrama de transições eletrônicas.	30
Figura 11 – Fotografia do espécimen de camarão fossilizado.	33
Figura 12 – Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).	33
Figura 13 – Esquema da câmara do microscópio com o posicionamento da amostra e dos detectores utilizados na varredura de campo amplo e na microanálise de EDS.	34
Figura 14 – Esquema do efeito saia.	35
Figura 15 – Formação da micrografia de campo amplo.	39
Figura 16 – Micrografia de campo amplo de elétrons retroespalhados evidenciando o contraste topográfico do fóssil. A barra de escala em branco corresponde a 10 mm.	41
Figura 17 – Micrografias de campo amplo de elétrons retroespalhados (BSE) evidenciando o contraste composicional do fóssil. A barra de escala em branco corresponde a 10 mm.	42
Figura 18 – Comparação entre a fotografia do espécimen de camarão fossilizado e a micrografia em alto contraste de campo amplo de elétrons retroespalhados (BSE).	43
Figura 19 – Histogramas dos valores na escala de cinza	44
Figura 20 – Imagens dos mapas elementares de oxigênio do fóssil obtidos com tensões variadas, (a) a 5 kV e (b) a 20 kV. A barra de escala em branco corresponde a 10 mm.	45

Figura 21 –Espectro de energia dispersiva por raios-X (EDS) para a área completa de fóssil, produzido a partir da varredura de campo amplo, soma de mais de 3.600 espectros.	46
Figura 22 –Mapas elementares de campo amplo dos elementos químicos que compõem a amostra de camarão fossilizado.	48
Figura 23 –Micrografia com as regiões características do espécimen fossilizado.	51

LISTA DE SIGLAS

BSE	elétrons restroespalhados (<i>Backscattered Electrons</i>)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
EDS	espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (<i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>)
FEG	canhão de emissão por campo (<i>Field Emission Gun</i>)
FT-IR	espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier Transform-Infrared Spectroscopy</i>)
GAD	<i>Gaseous Analytical Detector</i>
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
SE	elétrons secundários (<i>Secondary Electrons</i>)
TG	termogravimetria (<i>Thermogravimetric</i>)
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	A Importância dos Fósseis	13
1.2	A Bacia Sedimentar do Araripe	14
1.3	Motivação Para o Estudo dos Fósseis da Formação Ipubi . . .	16
1.4	Pesquisas Anteriormente Realizadas na Bacia Sedimentar do Araripe no Departamento de Física da UFC	18
2	ASPECTOS TEÓRICOS	21
2.1	Interação Elétron-Matéria	21
2.1.1	Elétrons Secundários	24
2.1.2	Elétrons Retroespalhados	25
2.1.3	Emissão de Raios-X	26
2.2	Etapas da Microscopia Eletrônica de Varredura	27
2.2.1	O Processo de Varredura e a Formação de Micrografias	28
2.2.2	A Microanálise Elementar	28
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	32
3.1	Parte Experimental	32
3.2	Material	32
3.3	Varredura de Campo-Amplo	34
3.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura em Baixo Vácuo	35
3.3.2	Tensão de Aceleração do Feixe de Elétrons	36
3.3.3	Processamento Digital de Imagens de Campo-Amplo	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1	Avaliação Morfológica do Fóssil Através de Imagens de Campo Amplo de BSE	38
4.2	Avaliação Composicional Através de Mapas Elementares de Campo Amplo	45
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

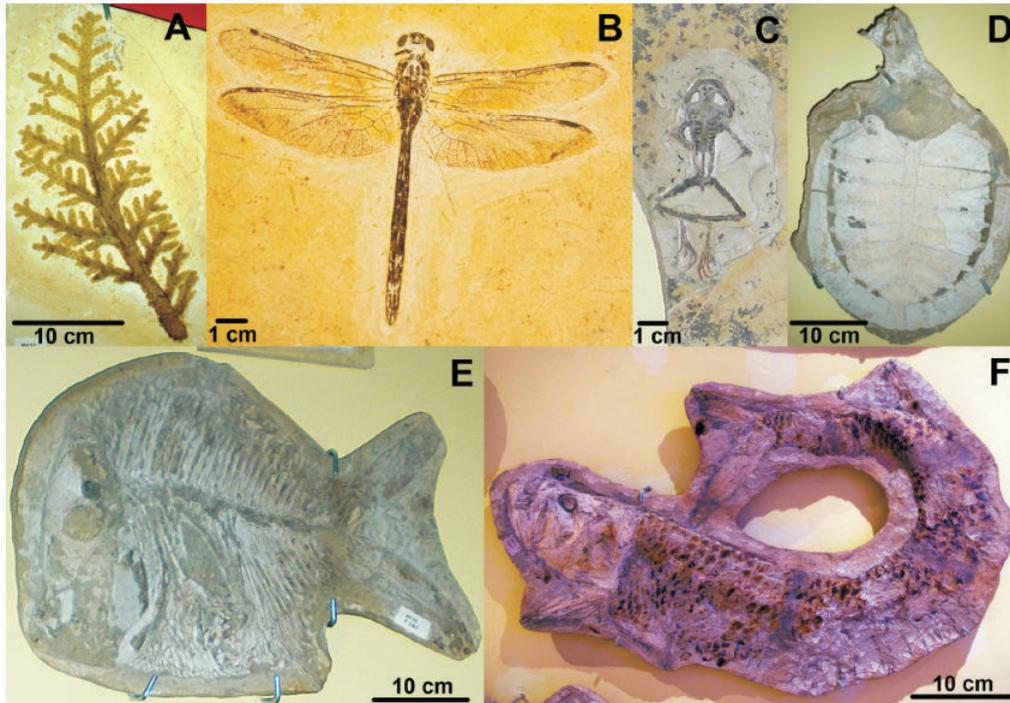
1.1 A Importância dos Fósseis

Fósseis são evidências ou restos de organismos vivos que viveram a milhões de anos atrás, formados através da ação de inúmeros processos químicos, físicos e biológicos que atuam no ambiente deposicional, os quais ainda não são perfeitamente compreendidos. Os fósseis podem ser preservados por meio de diferentes tipos de fossilização, tais como: carbonização, incrustação, substituição, recristalização, mumificação, mineralização, entre outros [1].

Os fósseis são uma importante ferramenta de investigação sobre o passado geológico, eles constituem uma grandiosa evidência do processo evolutivo, a chave para entender a história da vida, sendo úteis ao reconhecimento do paleoambiente formador das rochas sedimentares, assim como a idade relativa delas, a compreensão da movimentação dos continentes e a distribuição dos antigos mares, ou a compreensão da variação do clima terrestre, entre outros fatores que podem ser melhor compreendidos a partir do estudo dos mesmos. Do ponto de vista biológico por exemplo, esses vestígios se fazem necessários no entendimento de temas como o surgimento da vida na Terra, o aparecimento de novas espécies, crises biológicas, etc.

No Brasil, a Bacia Sedimentar do Araripe apresenta uma das maiores reservas fossilíferas do mundo. Na Figura 1 estão representados exemplos de fósseis encontrados nesta bacia. Este registro paleontológico descreve capítulos cruciais ao entendimento da evolução da história da Terra e da vida na região do Cariri. Os fósseis desta bacia vêm sendo estudados desde a época do Brasil Colônia (1530-1815), quando, em 1800, João da Silva Feijó descreveu em um relatório enviado ao governador da Capitania do Ceará a ocorrência de petrificações de peixes e anfíbios, na região do Cariri. No século XIX, expedições de naturalistas europeus foram enviadas a Bacia do Araripe para estudar o material fossilífero da região. Durante o século XX, estes estudos de paleontologia intensificaram-se e começaram a revelar a real grandeza da biodiversidade preservada nas rochas da região. E finalmente, nas últimas décadas do século XXI os estudos científicos atraíram relevante importância a este patrimônio internacional, além de fortalecer os movimentos de proteção aos principais sítios de interesse paleontológico [2].

Figura 1 – Alguns exemplares da riqueza fossilífera da Bacia Sedimentar do Araripe (Formação Santana).



Fonte: BOAS *et al.*, 2013, p. 159.

Legenda: Em A, *Brachyphyllum obesum* Heer, 1881; B, *Cordulagomphus fenestratus* Carle & Wighton, 1990; C, *Arariphrynus placidoi* Leal & Brito, 2006. Membro Romualdo: D, *Araripemys barretoii* Price, 1973; E, *Neoproscinetes penalvai* Figueiredo & Silva Santos, 1987; F, *Cladocycilus gardnery* Agassiz, 1841 (a nomenclatura dos fósseis foi obtida em Moura *et al.* 2006 e em Saraiva *et al.* 2010) [3].

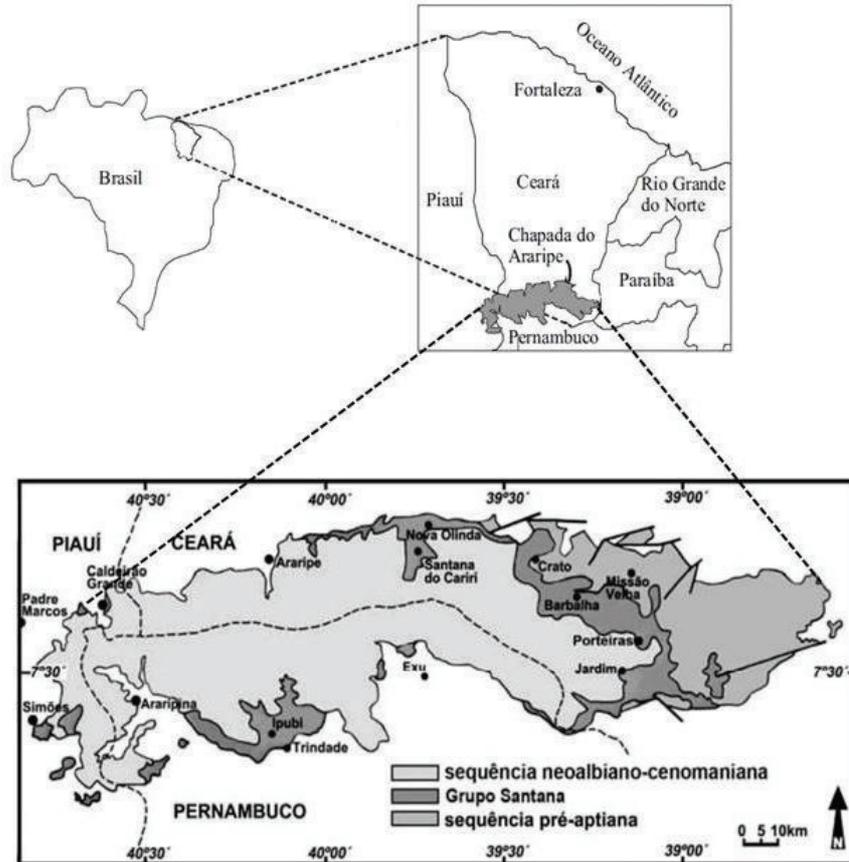
1.2 A Bacia Sedimentar do Araripe

Na região nordeste, a Bacia Sedimentar do Araripe é considerada uma das maiores jazidas fossilíferas do período Cretáceo do Brasil e do mundo. Com aproximadamente 12.000 km² de extensão, em termos geográficos ela está localizada ao sul do Estado do Ceará, noroeste do Estado de Pernambuco e leste do Estado do Piauí, (ver Figura 2). O período Cretáceo, entre 140 e 65 milhões de anos atrás, deteve grande importância em termos de eventos geológicos e ecológicos, valendo ressaltar a separação definitiva da África e da América do Sul, além da extinção de grandes répteis. Sob a Chapada do Araripe pode ser encontrada uma sequência completa das unidades geológicas que compõem a bacia, na qual a sequência cretácea, que foi depositada ao longo de quase 50 milhões de anos, encontram-se calcários laminados¹ (Formação Crato), bancos de gip-

¹A região do Cariri cearense, inserida na Bacia Sedimentar do Araripe, constitui um importante pólo mineral no que se refere a sua rica reserva de calcário laminado utilizado como pedra de revestimento sob o nome de “Pedra Cariri”. Os calcários, em sua maioria são formados a partir de carbonato de cálcio (CaCO₃).

sita $[\text{Ca}(\text{SO}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ e folhelhos pirobetuminosos² (Formação Ipubi), folhelhos e arenitos finos³ (Formação Romualdo), que compõem o Grupo Santana [4].

Figura 2 – Localização da Bacia Sedimentar do Araripe.



Fonte: Adaptada de SARAIVA *et al*, 2007, p. 42.

Legenda: Localização da área aflorante do Grupo Santana e localidades com maior ocorrência de concreções (modificado de BRUNO & HESSEL, 2006).

Neste contexto, a unidade geológica de interesse neste trabalho, a Formação Ipubi, é constituída por lentes de evaporitos⁴ (gipsita, $[\text{Ca}(\text{SO}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}]$) com espessura máxima de 30 m intercalados com um contato lateral com folhelhos cinza esverdeados, carbonatos (CO_3^{2-}) e arenitos, ver Figura 3. Os fósseis dessa formação são encontrados na camada de folhelho pirobetuminoso que podem ocorrer abaixo da camada de gipsita $[\text{Ca}(\text{SO}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ ou mais comumente sobre esse pacote de sulfato de cálcio (CaSO_4).

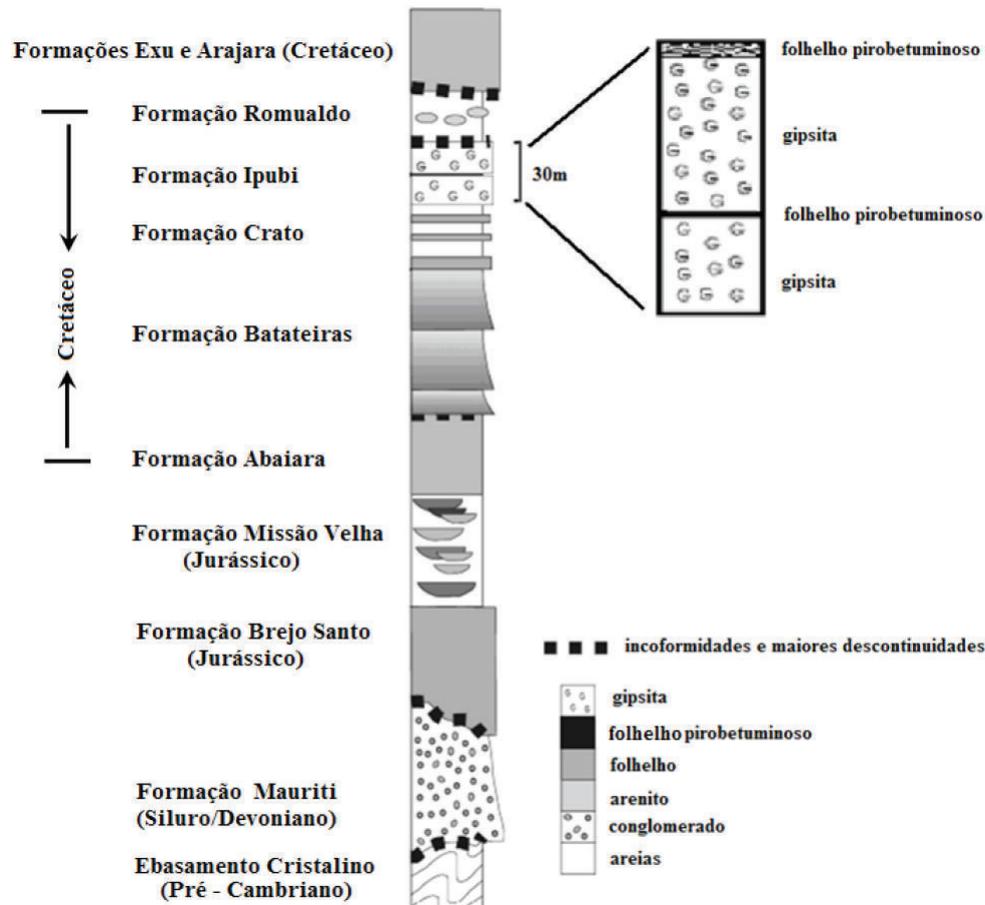
A Formação Ipubi compõe o pólo gessífero da região do Araripe, esse pólo é responsável por produzir 95% do gesso consumido em todo o Brasil, sendo a maio-

²Rochas sedimentares que possuem grãos de tamanho de argila (cerca de 4 μm de diâmetro). Possuem lâminas finas e paralelas esfoliáveis. Pirobetume é aquilo que se obtém por destilação seca, composto por hidrocarbonetos (compostos químicos constituídos apenas por átomos de carbono (C) e de hidrogênio (H)), semelhante ao petróleo [5].

³Rocha sedimentar resultante da consolidação de grãos de areia (cerca de 0,062 a 2 mm de diâmetro), composta por quartzo (SiO_2), feldspato $[(\text{Ca},\text{Na},\text{K})(\text{Al},\text{Si})_4\text{O}_8]$ (ou outros minerais de origem ígnea).

⁴Depósito salino originado por precipitação e cristalização direta a partir de soluções cristalizadas, os principais evaporitos são: gipsita $[\text{Ca}(\text{SO}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}]$, anidrita (CaSO_4), halita (NaCl), entre outros.

Figura 3 – Unidades geológicas da Bacia Sedimentar do Araripe.



Fonte: Adaptada de FILHO, 2011, p. 15.

Legenda: Camadas sob a Chapada do Araripe destacando a Formação Ipubi que é constituída por gipsita $[\text{Ca}(\text{SO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ e folhelho pirobetuminoso [4].

ria das jazidas localizadas nos municípios de Araripina-PE, Ipubi-CE e Trindade-PE [4]. O município de Araripina, por exemplo, localizado no oeste do estado de Pernambuco, caracteriza-se pela sua geodiversidade, sob aspectos mineralógicos, paleontológicos e geomorfológicos (ver Figura 2). Ela é conhecida como a capital do gesso, ficando a 690 km de Recife, capital pernambucana. É a maior cidade produtora do pólo gesseiro, o mais importante na produção de gipsita $[\text{Ca}(\text{SO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ do país. Nesse município, são encontrados muitos afloramentos de evaporitos constituídos por gipsita $[\text{Ca}(\text{SO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ e anidrita (CaSO_4) estratificadas [6].

1.3 Motivação Para o Estudo dos Fósseis da Formação Ipubi

O material fossilizado estudado no presente trabalho pertence ao grupo dos crustáceos decápodes, é uma espécie de camarão que foi recolhido na Bacia Sedimentar do Araripe, na Formação Ipubi. O processo de fossilização do camarão ocorreu por meio da mineralização, um tipo de fossilização bastante frequente, que acontece quando

substâncias minerais preenchem os poros, cavidades ou canúculas existentes no organismo antes vivo.

Os crustáceos são encontrados em todas as profundidades nos diversos ambientes marinhos, salobros e de água doce sobre a Terra. São os organismos dominantes em ecossistemas subterrâneos aquáticos, nos quais foi registrada a ocorrência de muitas espécies ainda não descritas [7]. De acordo com Vieira *et al* [8], os crustáceos são importantes na caracterização de ambientes saudáveis, pois funcionam como bioindicadores de qualidade ambiental, já que atuam no funcionamento da cadeia alimentar aquática, inclusive nas áreas periodicamente inundáveis. A preservação de camarões é um fato difícil de ocorrer no registro fossilífero, tendo em vista a propensão para decomposição que esse grupo sofre [9]. Poucos crustáceos decápodes do período Cretáceo têm sido descritos no Nordeste do Brasil, até o momento.

A exatidão na identificação do fóssil é essencial não somente para o estudo taxonômico, mas também para estudos em investigações paleontológicas, dinâmicas populacionais, biogeografia e evolução. Entretanto, a precariedade aparente do estado dos fósseis, ou seja, o seu pobre estado de preservação pode comprometer a identificação precisa das características que eles transmitem. Então, para sanar este problema, novas técnicas para análises detalhadas de fósseis são utilizadas cada vez mais, contribuindo para o avanço desses estudos. Técnicas que fazem uso de fotografia de alta-resolução [10], tomografia computadorizada [11], radiação síncroton [12]; técnicas espectroscópicas como, espectroscopia por espalhamento Ramam [13], espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier [14]; além de várias abordagens de microscopia como, microscopia eletrônica de transmissão [15], microscopia eletrônica de varredura [16], microscopia de luz-infravermelho [17], microscopia de varredura-transmissão [18] e microscopia de fluorescência de raios-X [19].

No contexto deste trabalho, a microscopia eletrônica de varredura foi aplicada ao fóssil de camarão através da técnica de varredura de campo amplo, onde milhares de micrografias magnificadas foram geradas e montadas coerentemente, formando imagens de campo amplo de alta definição, além da geração de mapas elementares de raios-X [20,21] com a respectiva composição química presente no material fossilizado. Esse método de varredura permite o resgate de informações morfológicas e elementares em camadas bem próximas da superfície de impressões de fósseis.

Usando esta abordagem de imagem de campo amplo, a investigação do fóssil de camarão pertencente a Formação Ipubi [22] forneceu uma gama de informações em várias escalas de comprimento [18], de algumas dezenas de micrômetros a centímetros, possibilitando uma interpretação da morfologia do fóssil e do contexto geológico que ele

estava inserido. O método também forneceu informações a respeito do processo de fossilização do camarão. A mineralização foi descrita por meio da composição elementar obtida nos mapas elementares de campo amplo. Sendo assim, micrografias de campo amplo com alta definição apresentam-se como uma poderosa ferramenta no entendimento do contexto paleontológico, geológico e geofísico da Bacia Sedimentar do Araripe [23–28], da região nordeste brasileira, e até mesmo no entendimento de aspectos do processo evolutivo da vida na Terra.

1.4 Pesquisas Anteriormente Realizadas na Bacia Sedimentar do Araripe no Departamento de Física da UFC

Na literatura são inúmeras as pesquisas relacionadas com o estudo de fósseis, cada trabalho visa contribuir para o entendimento do processo evolutivo da vida e do planeta Terra, mediante a caracterização da morfologia e do processo de fossilização. A seguir, alguns destes trabalhos serão brevemente discutidos, dando relevância a diversidade das técnicas de caracterização empregadas no estudo das espécimes fossilizadas.

O primeiro trabalho intitulado ”**Estudo de Coprólito da Bacia Sedimentar do Araripe por Meio de Espectroscopia FT-IR e Difração de Raios-X**” [29], refere-se ao estudo da composição de um coprólito⁵ da Bacia Sedimentar do Araripe, Formação Romualdo, por meio das técnicas experimentais de difração de raios-X e de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, com intuito de observar nessa composição aspectos relacionados aos hábitos alimentares dos peixes produtores do coprólito, que viviam na referida região durante o período Cretáceo.

Na técnica de difração de raios-X [29], observou-se que o coprólito, o nódulo calcário e o sedimento tinham composições bastante diferentes, uma vez que os respectivos padrões de difração apresentavam diferenças significativas. Concluiu-se que o coprólito era constituído por hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$, o nódulo calcário de carbonato de cálcio (CaCO_3) e o sedimento é formado por várias fases, entre elas o quartzo (SiO_2), não sendo possível a determinação de todas elas.

Já nos espectros de infravermelho analisados, observou-se uma boa concordância entre os espectros de infravermelho do padrão da hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$ com o coprólito, confirmando a caracterização do mesmo material por difração de raios-X. Entretanto, na comparação entre os espectros de infravermelho do coprólito e do nódulo calcário observou-se uma diferença em algumas regiões espectrais, em torno de 580 cm^{-1} . Para essa região, as bandas que aparecem no espectro do coprólito estão ausentes no es-

⁵Na Paleontologia o termo coprólito refere-se aos fósseis de fezes que mantém muitas vezes vestígios físicos ou mesmo moleculares de organismos que estiveram presentes nos intestinos dos indivíduos ou animais que os originaram.

pectro do nódulo, sendo associadas portanto as vibrações do PO_4 , grupo da hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$. A comparação do espectro infravermelho do nódulo com o obtido a partir da amostra de carbonato de cálcio (CaCO_3) apresentaram semelhanças, em exceção do primeiro espectro, de uma banda em torno de 1020 cm^{-1} , relacionada com a fase dominante na constituição do nódulo que é o carbonato de cálcio (CaCO_3), assim como indicado na difração de raios-X.

Portanto, depois de empregada as duas técnicas de caracterização concluiu-se que o coprólito é formado de hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$, o nódulo é composto substancialmente de carbonato de cálcio (CaCO_3) e o sedimento onde o nódulo foi encontrado possui uma série de materiais, mas nenhuma hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$. Sendo assim, uma vez que o conteúdo mineralógico do corpo dos animais, especialmente o osso, tem grandes quantidades de hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$, a presença desse mineral no material fossilífero dos coprólitos pode ser associada ao hábito carnívoro de seus produtores.

Logo, mediante esses resultados [29] pode-se chegar a conclusão de que outros materiais fósseis oriundos da Bacia Sedimentar do Araripe, submetidos à caracterização através do uso das técnicas de difração de raios-X e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, podem fornecer informações à respeito do processo de fossilização ocorrentes na bacia, e conseqüentemente descrever as condições do paleoambiente.

O segundo trabalho intitulado ”**Aplicação de Técnicas Físicas na Paleontologia: Um estudo de Fósseis da Formação Ipubi - Bacia Sedimentar do Araripe**” [5], refere-se a uma caracterização de quatro diferentes fósseis do período Cretáceo da Formação Ipubi, utilizando diversas técnicas físicas tais como, espectroscopia por espalhamento Raman, espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDS), difração de raios-X, fluorescência de raios-X, espectroscopia no infravermelho e análise termogravimétricas (TG).

O primeiro fóssil tratava-se de um osso de dinossauro terópoda que foi submetido as seguintes técnicas de caracterização, espectroscopia de EDS, fluorescência de raios-X, espectroscopia no infravermelho, além de difração de raios-X. O resultado obtido após as análises foi de que o fóssil era constituído predominantemente por hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$, e a rocha matriz de carbonato de cálcio (CaCO_3). Os resultados ainda foram complementados pela análise de medidas térmicas, confirmando a dinâmica de fossilização do terópoda.

O segundo fóssil analisado correspondia a restos de uma planta como partes terminais de *Brachyphyllum castilhoi*. A amostra também foi analisada pelas técnicas espectroscópicas de EDS, no infravermelho, fluorescência de raios-X, difração de raios-X,

além da espectroscopia Raman. Os resultados obtidos nas análises evidenciaram pela primeira vez a presença da fossilização por meio da piritização (FeS_2), onde o processo foi o responsável pelo bom estado de preservação do material. Assim como, a partir desse achado, foi possível sugerir os valores da temperatura e do pH do paleolago existente no período Cretáceo em parte da Bacia Sedimentar do Araripe.

E por fim, os dois últimos fósseis analisados tratavam-se de fósseis de peixes extintos *Vinctifer comptoni* e *Cladocyclus gardneri*. Eles foram submetidos às técnicas de difração de raios - X e espectroscopia no infravermelho. Os resultados obtidos após as análises indicam que no *Vinctifer comptoni* as fases dominantes na fossilização foram a hidroxiapatita [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$] na impressão do fóssil, enquanto que na matriz é a gipsita [$\text{Ca}(\text{SO}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$], embora existam traços de outras fases em menores quantidades. Já na impressão do *Cladocyclus gardneri*, as fases são a hidroxiapatita [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$] e a calcita (CaCO_3), além de existirem alguns traços de pirita (FeS_2). Na sua matriz observou-se que as fases dominantes são a calcita (CaCO_3), a pirita (FeS_2) e o quartzo (SiO_2).

Dessa forma, por meio de diversas técnicas físicas como de difração de raios-X, espectroscopia no infravermelho, espectroscopia Raman, análises térmicas e outras, pode-se caracterizar de forma minuciosa a constituição dos fósseis da Formação Ipubi, da Bacia Sedimentar do Araripe. E não só compreender os processos de fossilização no qual os organismos foram submetidos, mas também os processos físicos, químicos e biológicos nos quais o paleoambiente foi moldado.

A partir desta perspectiva, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de compreender cada vez mais os processos de mineralização que atuam no paleoambiente presente na Bacia Sedimentar do Araripe, e conseqüentemente, encontrar indícios que possam fornecer evidências do processo evolutivo da vida na Terra. Além de apresentar uma técnica microscópica de caracterização que fornece informações detalhadas em várias escalas de comprimento, de amostras relativamente grandes (escala de centímetros), através da montagem de micrografias de campo amplo com alta definição. Nas próximas seções, serão discutidos os principais conceitos relacionados a Microscopia Eletrônica de Varredura e a Microanálise Elementar, técnica aqui utilizada na caracterização do material fóssil estudado.

2 ASPECTOS TEÓRICOS

Neste capítulo, apresenta-se um breve discussão teórica dos conceitos relacionados à microscopia eletrônica de varredura com o intuito de se obter a compreensão da técnica de varredura de campo amplo aqui empregada. Além disso, apresenta-se também os conceitos relacionados ao mapeamento elementar de raios-X usado para descrever a composição química do material fóssil estudado.

2.1 Interação Elétron-Matéria

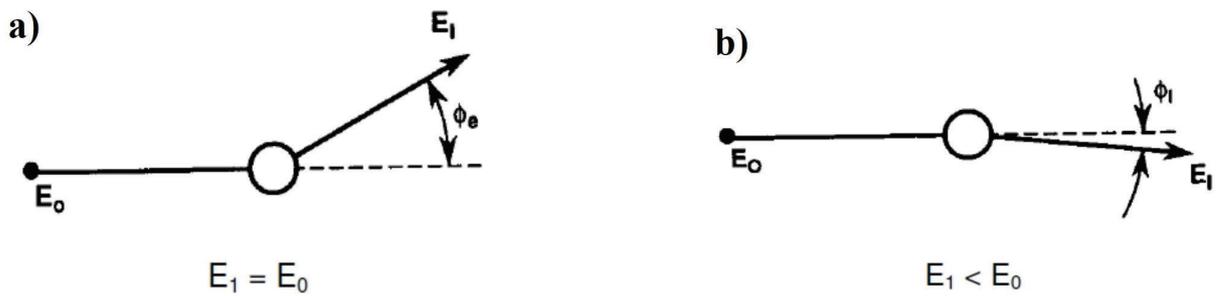
Toda a riqueza de informações provenientes da microscopia eletrônica sobre uma determinada amostra só se torna possível devido a multiplicidade de sinais que surgem quando um elétron interage com os átomos de uma amostra. O elétron ao penetrar na matéria gera diversos sinais fruto da interação. A coluna de um microscópio eletrônico deve sempre estar evacuada e o principal motivo se deve pelas interações susceptíveis a que os elétrons estão submetidos, ou seja, se por algum motivo existir moléculas na coluna do microscópio, o feixe de elétrons sofrerá espalhamento e a produção de um feixe colimado ficará comprometida.

Basicamente, nos microscópios eletrônicos os elétrons primários do feixe eletrônico de alta energia, penetram no espécimen e os mesmos, ou elétrons gerados após a interação são emitidos em diferentes regiões da amostra. O sinal emitido então é coletado em detectores e por conseguinte ocorre a formação das micrografias. Sendo assim, o ponto crucial para o entendimento de todo o processo está justamente nas interações possíveis entre os elétrons de alta energia provenientes do feixe e os átomos da amostra, sendo que sem essas informações, a compreensão das imagens obtidas ou dos espectros analíticos que o microscópio produz seriam de difícil interpretação.

Portanto, para uma melhor compreensão desse processo de interação elétron-matéria, alguns conceitos básicos devem ser considerados como, por exemplo, a probabilidade de um elétron em particular ser espalhado de uma maneira singular está diretamente ligada a **seção de choque** σ ou ao **livre caminho médio** λ dos elétrons. A seção de choque é expressa pela área efetiva em que o espalhamento de partículas certamente ocorrerá, já o livre caminho médio é a distância média percorrida por um elétron entre dois eventos que envolvem espalhamento. Existem dois diferentes tipos de espalhamento, o **espalhamento elástico** e o **espalhamento inelástico**, ver Figura 4 .

No espalhamento elástico, o elétron primário proveniente do feixe eletrônico

Figura 4 – Tipos de espalhamento.



Fonte: Elaborada pelo autora.

Legenda: Esquema de representação da colisão de um elétron primário com um átomo da amostra: a) espalhamento elástico e b) espalhamento inelástico.

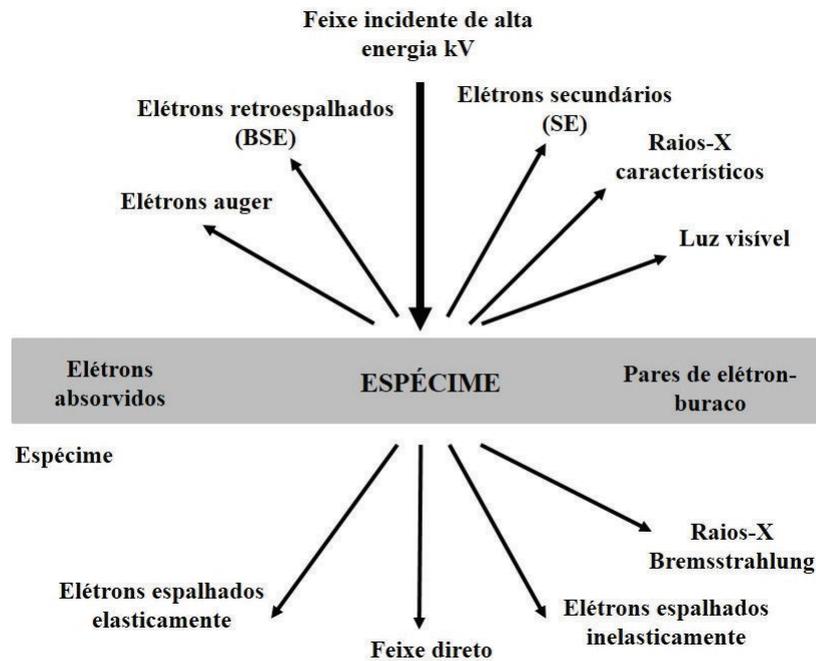
pode mudar de direção (0 a 180°) durante a interação com o átomo da amostra, entretanto nesse processo a sua energia cinética não muda, fazendo com que o elétron após a interação deixe a amostra ainda com sua energia original E_0 ($E_1 = E_0$). Durante o espalhamento inelástico, o elétron primário também pode ter um perda detectável na sua energia original E_0 , mas a sua direção não mudará significativamente ($\pm 0, 1^\circ$), e essa energia é transferida aos elétrons ou aos átomos da amostra, e ao deixá-la o elétron primário apresenta uma energia inferior à original ($E_1 < E_0$).

No esquema da Figura 5, estão expressas as interações de elétron-matéria provenientes da interação do feixe eletrônico num espécimen. Entretanto, os sinais representados na parte de baixo do espécimen só ocorrem se a mesma for de espessura muito fina, permitindo assim que elétrons a atravessassem. Esse é o princípio básico da Microscopia Eletrônica de Transmissão. Neste trabalho, o objeto de estudo trata-se de uma amostra espessa, e os elétrons ao invés de atravessá-la, irão colidir na sua superfície, gerando os sinais de espalhamento analisados pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Sendo assim, nem todos os sinais da figura serão aqui explanados, somente os sinais detectados no MEV e utilizados na caracterização do fóssil de camarão.

O microscópio eletrônico de varredura é um dos instrumentos mais versáteis disponíveis para observação e análise de amostras espessas. No MEV, a área a ser examinada ou o microvolume a ser analisado é irradiado por um fino feixe de elétrons focalizado sobre a amostra, que pode ser utilizado para varrer toda uma área superficial ou apenas um ponto específico que se queira investigar. O volume de interação elétron-matéria é influenciado pelo feixe e por alguns parâmetros da amostra, tais como: a energia do feixe, o número atômico dos constituintes da amostra, a inclinação da superfície da amostra, entre outros.

A partir das características do feixe, o volume de interação é diretamente proporcional a sua energia, isto é, quanto maior for a energia do feixe, maior será o

Figura 5 – Interação elétron-matéria.



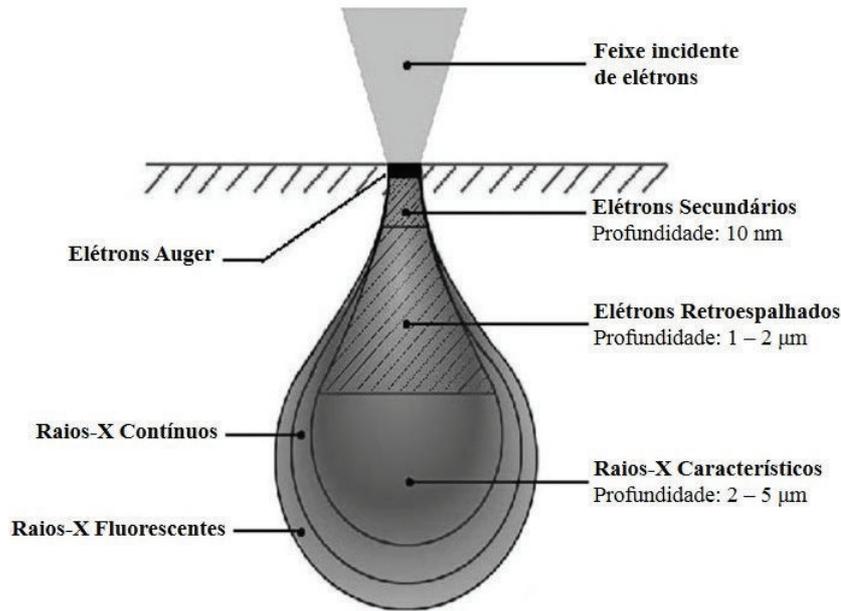
Fonte: Adaptada de CARTER *et al*, 2009, p. 7.

Legenda: Sinais gerados quando um feixe de elétrons interage com um espécime. As direções mostradas para cada sinal nem sempre representam a direção física do sinal, mas indicam, de uma forma relativa, o gradiente onde o sinal é mais forte ou onde é detectado.

volume de interação com o espécime. Já de acordo com o número atômico, o volume diminui com o aumento do mesmo, uma vez que a seção de choque também aumenta, e os elétrons então sofrerão colisões com uma maior facilidade, diminuindo o seu livre caminho médio e conseqüentemente reduzindo o seu nível de penetração na amostra. A influência causada pela inclinação da superfície da amostra, no volume de interação ocorre da seguinte forma, o feixe eletrônico não penetra tão profundamente na amostra quando existe reduções causadas por inclinações na área da superfície da mesma, gerando assim um menor volume de interação. Já quanto mais plana for a superfície da amostra em relação ao feixe eletrônico, maior será o volume de interação com o espécime.

Alguns dos sinais que são produzidos na interação elétron-amostra incluem **elétrons secundários (SE)**, **elétrons retroespalhados (BSE)**, **raios-X característicos**, entre outros fótons de várias energias [31] (ver Figura 6). Nas subseções a seguir, serão ponderadas as principais características dos sinais mais importantes para a Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 6 – Volume de interação elétron-matéria.



Fonte: Adaptada de GALLEGO, 2015.

Legenda: Volume de interação do feixe de elétrons na amostra, com a localização dos principais sinais emitidos de acordo com a suas profundidades.

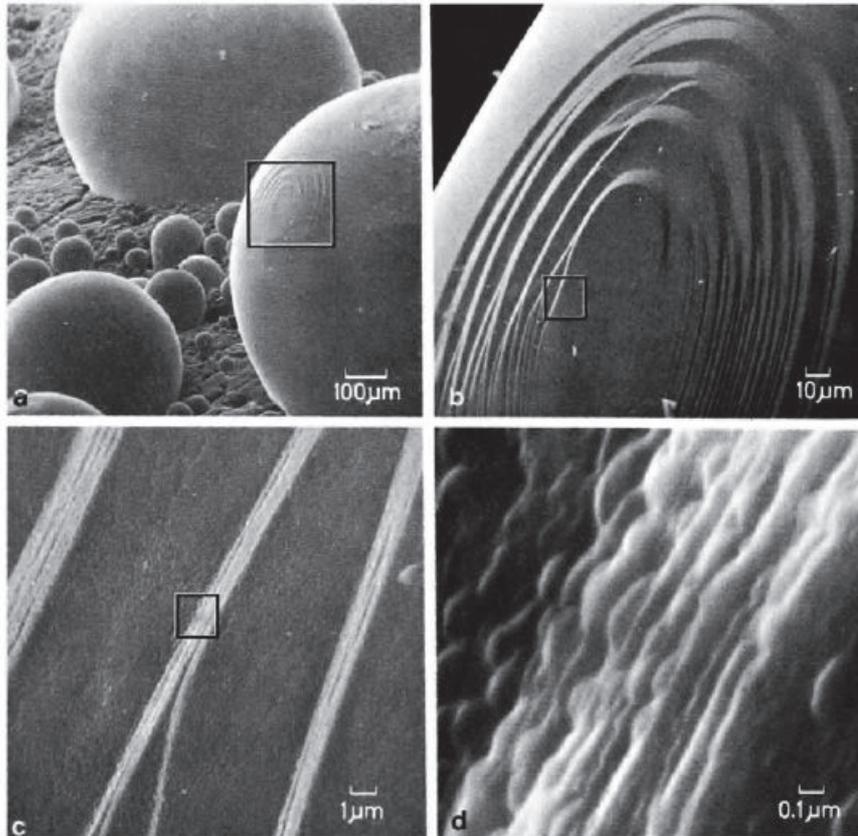
2.1.1 Elétrons Secundários

Os elétrons secundários são provenientes do espalhamento inelástico que ocorre entre os elétrons de alta energia do feixe primário com os átomos da amostra. Estes elétrons escapam da amostra com energia inferior a 50 eV. Essencialmente, eles compreendem aos elétrons com pouca energia que são emitidos após a interação elétron-matéria com a banda de condução nos metais ou com a banda de valência nos semicondutores ou isolantes, os elétrons secundários emergem das proximidades da superfície da amostra (ver volume de interação preenchido por eles na amostra na Figura 6). Como consequência, tem-se que o sinal de elétrons secundários seja empregado na Microscopia Eletrônica de Varredura como uma ferramenta eficaz na geração de imagens de topografia da amostra, onde as micrografias geradas apresentam elevada profundidade de campo. Além disso, quanto menor for a tensão de aceleração do feixe mais superficial será a geração de SE.

As micrografias geradas pelos SE possuem pouca relação com a composição da amostra. Este fato é verificado pelo comportamento superficial que esse sinal apresenta. Como o feixe de elétrons possui pequena penetração na geração desse sinal, os elétrons que escapam da amostra carregam informações mínimas a respeito da composição. Entretanto, essa baixa espessura de escape, onde somente os elétrons que se encontram na superfície da amostra possuem energia suficiente para deixá-la, resulta num sinal que carrega a maior resolução de imagem. Isso acontece por que o volume de interação dos elétrons

secundários apresenta áreas de seção transversal que se aproximam ao diâmetro do feixe de elétrons incidentes.

Figura 7 – Micrografias geradas por elétrons secundários.



Fonte: REIMER, 1998, p. 4.

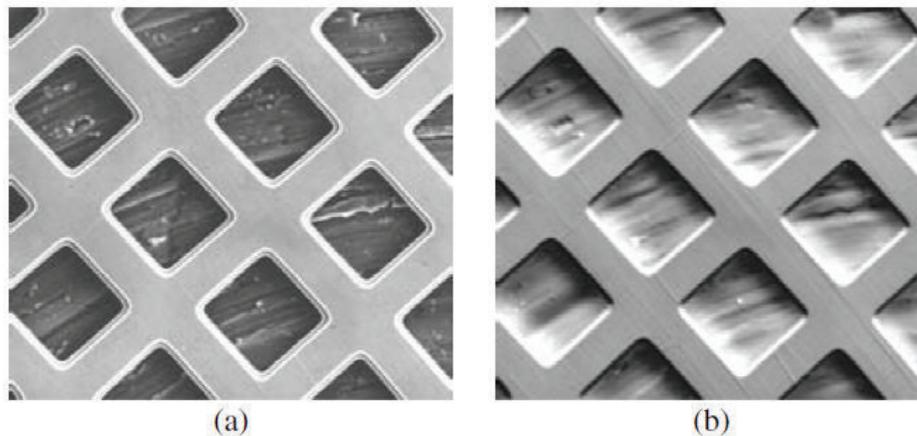
Legenda: Exemplo de uma série de aumento de magnificação (imagens geradas por SE de partículas de chumbo esféricas).

2.1.2 Elétrons Retroespalhados

O sinal de elétrons retroespalhados é resultado de uma série de colisões elásticas e inelásticas, produzidas entre os elétrons primários do feixe e os átomos do espécimen. A mudança de direção durante a interação é o fator responsável pela emissão dos elétrons da amostra. Estes elétrons possuem energia variável entre 50 eV até o próprio valor da energia dos elétrons incidentes E_0 . Já em relação a resolução das micrografias, esta se torna inferior à resolução produzida pelos elétrons secundários, pois o volume de interação produzido por esses elétrons é maior (ver Figura 6). Essa característica dos BSE também possui dependência com o número atômico Z da amostra; quanto maior o número atômico maior a seção de choque entre as partículas, e conseqüentemente menor o volume de interação e maior a resolução das micrografias. Além disso, quanto menor o volume de interação maior o rendimento de emissão dos BSE. Esse último aspecto faz com que os BSE sejam utilizados para a diferenciação de elementos químicos presentes no espécimen. O sinal dos

elétrons retroespalhados também contém informações a cerca da topografia da amostra, uma vez que o rendimento de emissão dos BSE depende do ângulo de incidência do feixe de elétrons primários com a superfície do espécimen; quanto menor a inclinação da superfície da amostra, menor será o desvio angular total dos elétrons retroespalhados, aumentando o rendimento de emissão dos BSE. Já para uma maior inclinação da superfície da amostra, maior será o desvio angular total dos elétrons retroespalhados, e conseqüentemente haverá uma diminuição no rendimento de emissão dos BSE.

Figura 8 – Micrografias geradas por elétrons retroespalhados.



Fonte: REED, 2005, p. 50.

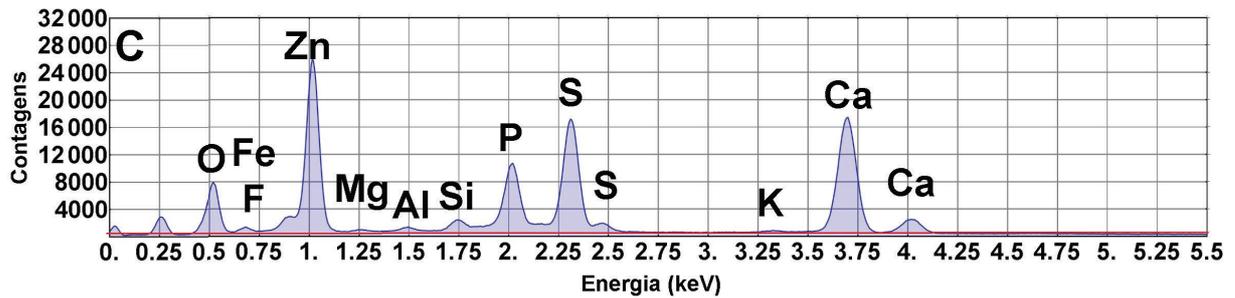
Legenda: Imagens geradas por elétrons retroespalhados de uma grade de cobre montada em um suporte de alumínio: (a) modo composicional, usando adição de sinal de BSE (o brilho depende principalmente do número atômico); e (b) modo topográfico, usando a diferença de sinal de BSE (mostra um efeito de sombra topográfica, mas nenhuma diferença no brilho médio do cobre e alumínio).

2.1.3 Emissão de Raios-X

Durante a interação inelástica do feixe de elétrons com a amostra, os raios-X podem ser originados de duas maneiras, perda de momento dos elétrons com geração de raios-X (*Bremsstrahlung* ou raios-X contínuos), ou através da ionização das camadas eletrônicas internas de um átomo (raios-X característicos). Estas radiações contém as informações que compõem os espectros, tais como as características composicionais que especificam o átomo ou os átomos que compõem o volume de interação da amostra, obtidas pelos raios-X característicos, ou apenas as características que formam o *background* do espectro, obtidas pelos raios-X contínuos (ver Figura 9).

O processo de geração de raios-X contínuos ocorre da seguinte maneira, um elétron primário com determinada energia é desviado na interação com o núcleo atômico da amostra. Devido ao campo coulombiano gerado, o elétron pode perder uma quantidade significativa de energia (até mesmo a sua energia cinética total), resultando na emissão

Figura 9 – Exemplificação de um espectro de EDS.



Fonte: Elaborada pelo autora.

Legenda: Os raios-x característicos revelam-se como picos sobre um fundo de raios-x contínuos. Representação de um espectro de EDS, a região de 0 a 5,5 keV do espectro revela os raios-X característicos de um certo espécimen, onde a radiação de *background* está indicada por uma linha vermelha.

de um fóton. Vale ressaltar, que a intensidade desse sinal é proporcional a corrente do feixe, ao número atômico da amostra e a energia do feixe, e que estes sinais formam um plano de fundo no espectro sob os picos de raios-X característicos.

Já os raios-X característicos representam o sinal mais importante na análise composicional do espécimen. O feixe eletrônico ao interagir com elétrons que estão fortemente ligados a camadas internas de um átomo da amostra, faz com que um elétron seja ejetado de uma camada. O átomo então é deixado num estado excitado, por exemplo, se o elétron ejetado for da camada eletrônica mais interna (camada K), o átomo terá ganho pelo menos E_K de energia, e esse elétron terá uma energia cinética da ordem de alguns eV a keV, dependendo da interação. Sendo assim, como o átomo se encontra num estado de excitação, faltando um elétron na sua camada interna, por tendência natural ele tende a relaxar, ou seja, voltar ao seu estado fundamental (estado de mais baixa energia) através de transições eletrônicas permitidas entre elétrons das camadas exteriores que irão preencher a vacância da camada interna. As energias desses elétrons nas camadas eletrônicas possuem valores bem definidos, característicos para cada elemento.

2.2 Etapas da Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica, como é abordada atualmente, não é somente uma técnica simples capaz de observar estruturas ou determinar o tamanho delas. Pelo contrário, a microscopia eletrônica apresenta uma diversidade de modos de operação que oferecem a possibilidade de obter informações sobre a estrutura, topologia, morfologia e composição de um material. O resultado das observações do material são obtidos através de inúmeras imagens e métodos de espectroscopia que representam o ponto crucial para caracterização de qualquer amostra, desde de amostras inorgânicas a orgânicas, ou até mesmo de micro ou nanoestruturas. Nas próximas subseções, serão descritas as principais etapas que

constituem a técnica da microscopia eletrônica de varredura

2.2.1 O Processo de Varredura e a Formação de Micrografias

A ação da varredura é obtida variando a intensidade da corrente elétrica nas bobinas de varredura em função do tempo, onde o feixe eletrônico percorre uma sequência de posições na amostra de acordo com o sistema de coordenadas adotado (x,y). A interação elétron-amostra gera os sinais adquiridos nos detectores. No sistema de varredura, o feixe é dirigido para uma localização selecionada do plano na amostra, lá ele permanece por um breve período de tempo (*the dwell time*), e logo em seguida é transferido rapidamente para uma próxima localização. Na varredura de uma área, a imagem é formada pelo mapeamento de uma área, extraindo as informações necessárias para o entendimento da amostra. A exibição das imagens na tela de visualização é construída em sincronismo com a varredura na amostra. O sinal então é amplificado e processado, com ajustes de brilho e contraste das imagens por exemplo, de forma a visualizar as características de interesse através de uma função contraste.

As micrografias eletrônicas são imagens dos campos de observação do espécimen com ampliações de algumas dezenas até milhões de vezes do objeto de estudo. Quando uma imagem é digitalizada ela é mapeada como uma matriz de pontos ou elementos denominados pixels (do inglês *picture elements*). Cada pixel incorpora informação sobre intensidade (e tonalidade) na forma de dígitos em uma determinada escala [35]. Assim que adquiridas, as imagens ainda podem ser manipuladas de forma a otimizar ainda mais a sua qualidade, em geral alguns programas de processamento de imagens podem ser utilizados para ajustes no brilho, contraste ou até mesmo com algoritmos matemáticos embutidos em programas que podem minimizar ruídos, suavizar ou intensificar as cores da imagem. O *Adobe Photoshop* por exemplo, constitui um modelo de programa de processamento de imagem que oferece recursos capazes de otimizar as micrografias obtidas no MEV.

2.2.2 A Microanálise Elementar

A microanálise de raios-X é uma técnica de espectroscopia disponível no MEV que é capaz de obter informações químicas em volumes da ordem de micrometros, e essas informações possuem caráter qualitativo e quantitativo dos elementos químicos que compõem a amostra, onde os sinais responsáveis por essa análise, os raios-X, são resultados da interação elétron-matéria. Outra grande vantagem de utilização desta técnica é a preservação do estado da amostra, pois a incidência do feixe de elétrons sobre a amostra não causa destruição a mesma, de tal forma que ela pode ser reexaminada por outras

técnicas posteriormente. A espectroscopia de energia dispersiva por raios-X (EDS) é efetuada por meio de um detector de estado sólido usado para coletar os raios-X e convertê-los em sinais elétricos, que por sua vez serão processados e conseqüentemente identificada as energia dos raios-X característicos emitidos por cada elemento que forma o espécimen.

Quando um elétron preenche uma vacância previamente criada numa camada atômica mais interna do espécimen, logo após o processo de ionização dos átomos do material, ocorre a emissão de fótons de raios-X característicos. Entretanto, durante o relaxamento dos átomos algumas regras de seleção envolvendo os números atômicos se fazem necessárias para que esse processo de transição seja permitido. Por exemplo, se o elétron ejetado durante o processo de ionização for proveniente da camada atômica mais interna (camada K), o elétron mais provável para preencher essa vacância virá da próxima camada mais interna (camada L), criando portanto uma série de transições entre as duas camadas, emitindo raios-X com energias bem definidas (ver Figura 10). A lei de Moseley constitui a base da análise de raios-X, que é, a identificação dos elementos constituintes do material, e é expressa pela seguinte relação:

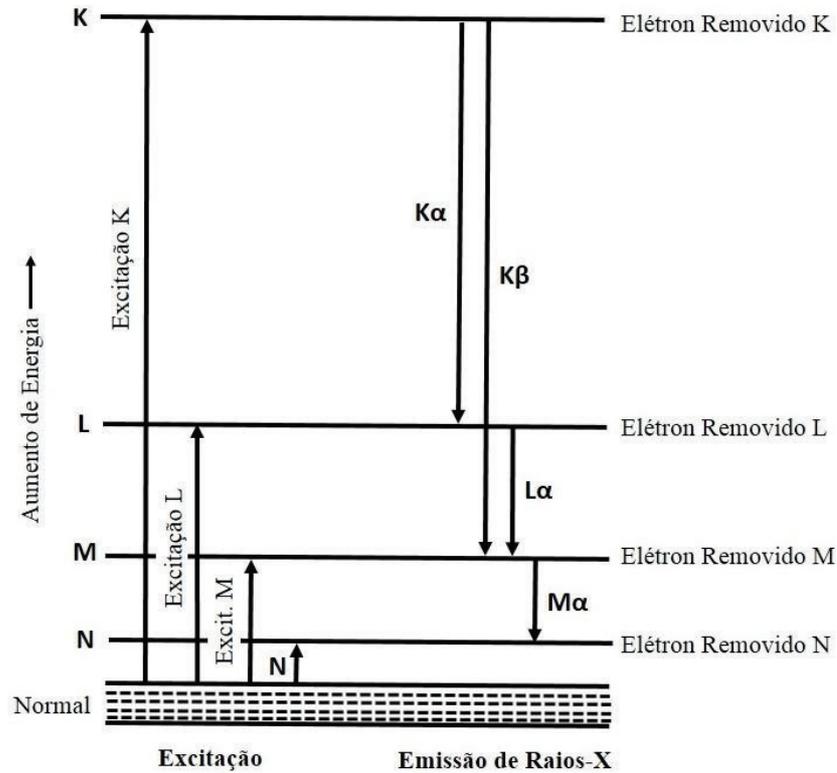
$$E = A(Z - C)^2 \quad (2.1)$$

onde E é a energia da linha de raio-X, e A e C são constantes que diferem para cada série de raios-X.

A microanálise elementar identifica os elementos presentes na amostra de duas maneiras, a primeira corresponde a uma **análise qualitativa**, onde a identificação dos elementos é feita mediante a interpretação dos espectros que são formados por picos característicos sobre o *background*. Porém, a precisão desse tipo de recurso depende do bom funcionamento do sistema de EDS, isto é, o padrão do sistema deve estar devidamente calibrado para um posicionamento adequado dos picos de raios-X em relação à sua energia. A energia crítica de posicionamento dos picos deve estar dentro de ± 10 eV para fótons com energia acima de 1 keV. O próprio *software* responsável pela execução da análise aplica um método de identificação dos picos dentro das restrições definidas para cada tipo de elemento. O operador por sua vez deve utilizar suas informações prévias da amostra para verificar a precisão dos resultados obtidos.

Para uma interpretação satisfatória de um espectro de energia dispersiva é preciso considerar alguns fatores, como por exemplo a intensidade dos picos e a família das linhas de raios-X. A intensidade dos picos fornece importantes informações na identificação dos elementos: a intensidade dos picos característicos devem ser três vezes maior do que a do *background*, pois somente os picos estatisticamente significativos serão considerados no processo de identificação. Já a massa aproximada de membros de picos de uma família

Figura 10 – Diagrama de transições eletrônicas.



Fonte: Adaptada de GOLDSTEIN *et al*, 2003, p. 277.

Legenda: Esquema dos níveis de energia de um átomo demonstrando a excitação das camadas K,L,M e N e a formação de raios-X $K\alpha$, $K\beta$, $L\alpha$ e $M\alpha$. As possíveis transições que resultam na emissão de raios-X característicos possuem dependência com os números quânticos n , l e j , através da regra de seleção de dipolo: $\Delta l = \pm 1$, $\Delta j = \pm 1$ e $\Delta s = 0$.

fornece outra fonte de informação crucial na identificação de elementos. Uma linha de raios-X mais intensa numa região de alta energia do espectro possui picos bem separados dentro de sua família. Além disso, uma linha de raios-X $K\alpha$ apresenta linha mais intensa do que uma $K\beta$.

A análise qualitativa se apresenta como um pré-requisito para o segundo tipo de análise, a **análise quantitativa**, uma vez que se os elementos previamente identificados na amostra pode conter erros na sua interpretações e logicamente, o resultado da análise quantitativa também apresentará erro. Com a preparação correta da amostra e o uso de *softwares* adequados, é possível analisar quantitativamente a composição da amostra com precisão de até 1%. Na microanálise química por EDS, considera-se que acima de 10% em massa um elemento está presente em grande quantidade; entre 1 e 10% em pequena quantidade; e menor que 1% apenas como elemento traço. Para que a análise quantitativa apresente uma homogeneidade nos resultados composicionais, a amostra deve preferencialmente ser plana com uma superfície polida, posicionada em um ângulo conhecido em relação ao feixe de elétrons, e ao espectrômetro. Irregularidades na

superfície da amostra, tamanho, forma, inclinação da superfície, podem influenciar na interação dos elétrons e na geração dos raios-X, diminuindo a eficiência do procedimento de análise. Vale ressaltar que, a análise quantitativa é um procedimento que neste trabalho foi realizado automaticamente pelo *software* de microanálise de EDS.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo será apresentado o aparato experimental utilizado no desenvolvimento do presente trabalho: o microscópio utilizado para a caracterização do espécimen de fóssil, juntamente com os dispositivos que o compõe, além da técnica de varredura usada para obter as micrografias de campo amplo, e a microanálise de raios-X.

3.1 Parte Experimental

Dos trabalhos realizados, no material fóssil recolhido na Formação Ipubi, obteve-se imagens eletrônicas de campo amplo por meio do microscópio eletrônico de varredura, e as micrografias foram obtidas através da detecção de elétrons retroespalhados (BSE). Além disso, fez-se também o mapeamento elementar da amostra por meio da espectroscopia de energia dispersiva por raios-X (EDS), o que revelou características como morfologia, estrutura e composição.

3.2 Material

O fóssil de camarão do período Cretáceo encontrado na Bacia Sedimentar do Araripe aqui em análise, foi cedido pelo Laboratório de Paleontologia da Universidade Regional do Cariri (URCA) - LPU, com número de tombo LPU 918. Ele foi coletado na mineradora Campevi, área de exploração de sulfato de cálcio (gipsita, CaSO_4), localizada a 24 km da cidade de Araripina, e é pertencente a Formação Ipubi. É um camarão que pertence à superfamília *Penaeidae*, se caracterizando por ter um ciclo de vida complexo determinado por movimentos migratórios de caráter trófico¹ e reprodutivo [36]. São preponderantemente oceânicos, realizando todo seu desenvolvimento em alto mar, porém com um maior grau de dependência de águas protegidas². A maioria dos representantes deste grupo é bentônica³ e marinha, podendo ser encontrados desde pequenas profundidades até 600 metros [36, 37].

No laboratório de Paleontologia da URCA, o material fossilizado foi preparado usando um microscópio de luz (SMZ-1500, Nikon). A amostra possui cerca de 28 mm de comprimento e 10 mm de largura, ver Figura 11.

¹Migrações de caráter alimentar, aquela que ocorre em direção a região de alimentação.

²Um ambiente redutor apresenta características redutoras da água, ou seja, águas com baixíssimas concentrações de oxigênio dissolvido.

³Organismos bentônicos apresentam relação íntima com o fundo dos oceanos.

Figura 11 – Fotografia do espécimen de camarão fossilizado.



Fonte: Elaborada pelo autora.

Legenda: O espécimen foi encontrada no Formação Ipubi, na Bacia Sedimentar do Araripe. A barra de escala em branco corresponde a 10 mm.

Logo após, a amostra fossilizada foi avaliada num Microscópio Eletrônico de Varredura - MEV, Quanta 450 (FEI) (ver Figura 12), por meio da técnica de varredura de campo-ampla. Os sinais emitidos durante a interação do feixe eletrônico com a amostra foram coletados num detector de diodo de estado sólido do tipo GAD (gaseous analytical detector) anular com o intuito de gerar imagens de elétrons retroespalhados, além da utilização de um detector de raio-X para obter a microanálise elementar da amostra.

Figura 12 – Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).



Fonte: Elaborada pelo autora.

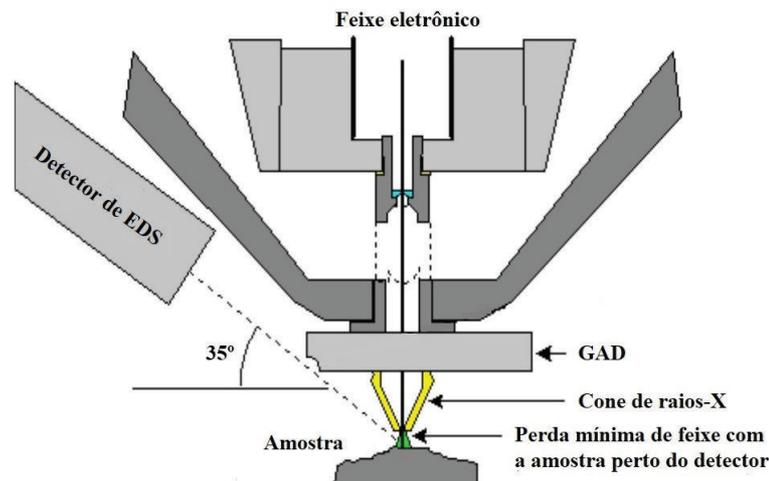
Legenda: Microscópio utilizado para varredura de campo amplo e microanálise composicional de raios-X da amostra fossilizada (Central Analítica da Universidade Federal do Ceará - UFC).

3.3 Varredura de Campo-Amplo

A técnica de varredura de campo amplo foi realizada no microscópio Quanta-450 (FEI) equipado com um canhão de emissão por campo ("field emission gun", FEG). Vale ressaltar, que esse tipo de fonte de emissão de elétrons apresenta grandes vantagens quando comparado à canhões de fontes termiônicas, tais como, maior estabilidade do feixe, brilho elevado, durabilidade do tempo de vida, além de uma menor dispersão do feixe em energia. O estágio de suporte para o espécimen possui cerca de 100 mm de comprimento. Um sistema de detecção de raios-X modelo 150 (Oxford) foi utilizado para a espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

O espécimen fossilizado foi introduzido na câmara do microscópio sem nenhuma preparação especial, a não ser de um jato de ar sobre a amostra, possibilitando a eliminação de artefatos de poeira gerados durante o corte para deixar a amostra plana e selecionar a área da impressão do fóssil aqui analisado. Montou-se a amostra no estágio de suporte considerando a melhor orientação em relação ao feixe de varredura, ao detector de elétrons retroespalhados (BSE) e ao detector de raios-X, sendo que o estágio permitiu um posicionamento com precisão micrométrica. O detector dos elétrons retroespalhados foi fixado no final da peça polar (lente objetiva) e o detector de raios-X com um ângulo de coleta de 55° em relação ao eixo da coluna do MEV, posicionado aproximadamente no final da peça polar (ver Figura 13).

Figura 13 – Esquema da câmara do microscópio com o posicionamento da amostra e dos detectores utilizados na varredura de campo amplo e na microanálise de EDS.



Fonte: Adaptada de DUFEEK, 2013, p. 177.

A câmara do microscópio foi mantida em baixo vácuo, cerca de 100 Pa, uma vez que nessas condições evitou-se o carregamento da amostra, isto é, quando o número de elétrons emitidos pela amostra não equivale ao número de elétrons incidentes, o material

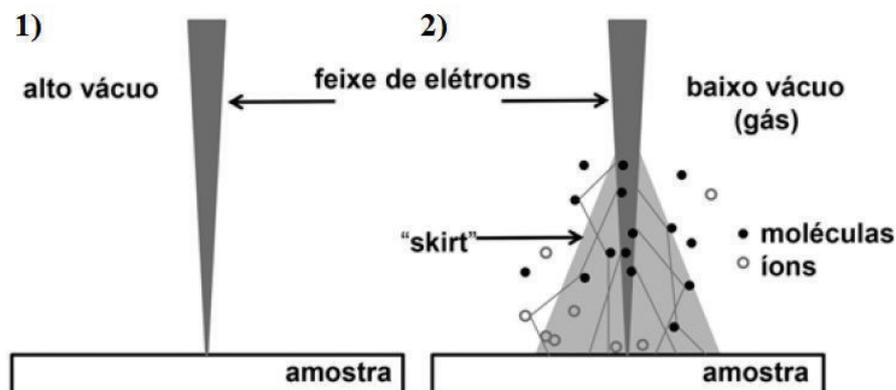
sofre carregamento eletrostático, por não ser condutor.

3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura em Baixo Vácuo

A escolha do sistema de vácuo na câmara do MEV depende do tipo de material em estudo, como neste caso trata-se de uma material fossilizado (amostra isolante), o baixo vácuo para esse tipo de material garante a sua preservação [35], uma vez que a aquisição de imagens desse tipo de amostra deve ser realizada sem a sua metalização. Acentua-se, que o MEV em baixo vácuo détem uma pressão mais alta na câmara do que a pressão no canhão e na coluna do microscópio; tanto o canhão como a coluna devem ser mantidos em alto vácuo pelo seguintes fatores. Como os componentes estão conectados entre si, para possibilitar a passagem do feixe de elétrons até a superfície da amostra, o gás existente na câmara adentra para a região da coluna através de uma abertura de vácuo diferencial e é removido por meio de uma bomba de vácuo, que bombeia a região logo acima da abertura, estabelecendo um gradiente de pressão.

Dessa forma, alguns efeitos são ocasionados por esse aumento de pressão, como por exemplo, o espalhamento do feixe principal devido à colisão entre os elétrons primários e os íons e moléculas de gás presentes na câmara. Esse efeito de alteração de trajetória dos elétrons primários é denominado de *skirt* (significa "saia" em inglês). A superposição dos espalhamentos resulta em um cone emborcado (cinza claro) (ver Figura 14), e quanto mais elevada for a pressão da câmara, maior será esse o *skirt*, tanto em intensidade como em diâmetro [39].

Figura 14 – Esquema do efeito saia.



Fonte: HINRICHS, 2014, p. 99.

Legenda: Feixe focalizado de elétrons em 1) alto vácuo e 2) baixo vácuo, onde há a formação de íons que irão neutralizar a superfície da amostra e o "efeito *skirt*", devido aos espalhamento dos elétrons primários pelos átomos e moléculas do gás.

3.3.2 Tensão de Aceleração do Feixe de Elétrons

A resolução das micrografias eletrônicas obtidas em baixo vácuo se dá em função da ordem de detecção de elétrons retroespalhados. No nosso estudo, as imagens foram obtidas pelas tensões de aceleração do feixe variadas de 5 a 20 kV, com a abertura da lente condensadora em 50 μm . Sendo que as imagens adquiridas com a tensão de 20 kV apresentaram uma melhor relação sinal-ruído, tanto nas imagens de BSE como nos mapas elementais. A corrente do feixe de elétrons incidente foi de aproximadamente 10 nA, valor fornecido pelo fabricante levando em consideração os parâmetros usados na coluna do MEV, como a abertura da condensadora, o ângulo de convergência da lente condensadora e a tensão de aceleração.

Para que micrografias aqui adquiridas apresentassem elevada profundidade de foco, foi definido o tamanho da abertura da condensadora (50 μm) e fixada a distância de trabalho para toda a análise (15 mm). A variação do tamanho do *spot* do feixe e do caminho do feixe (distância trabalho) estão diretamente ligados com a resolução e a definição das imagens.

3.3.3 Processamento Digital de Imagens de Campo-Amplo

As imagens a partir dos elétrons retroespalhados e dos raios-X apresentadas neste trabalho foram obtidas digitalmente por meio do *software* comercial *AZtec* (Oxford). A ação da varredura gera o sinal dos elétrons que é coletado nos detectores e logo em seguida, transferido para o monitor do computador onde o elemento de imagem (pixel) é gerado. Cada pixel corresponde a uma região que o feixe varre. Tomando a varredura linear, o pixel pode ser considerado como um quadrado no qual a sua dimensão depende exclusivamente da área varrida na amostra. A dimensão linear do pixel é dada pela expressão,

$$D_{pix} = \frac{L_{am}}{N_{pix}} \quad (3.1)$$

sendo L_{am} o comprimento da varredura na amostra e N_{pix} o número de regiões discretas (pixel) ao longo da linha de varredura.

Para a geração de imagens de campo-amplio, foi feita uma sobreposição coerente de áreas marginais (uma fronteira que contém 20% da área de cada imagem) de imagens adjacentes independentes, obtidas após o deslocamento progressivo do estágio do microscópio ao longo do eixo x e y, de forma que o feixe de elétrons percorra a área do fóssil como um todo. Os resultados das imagens de campo amplo aqui mostradas contém a montagem de mais de 3.600 imagens adjacentes obtidas durante a varredura da amostra com 1000x de magnificação (campos horizontais e verticais de 0,41 mm e 0,28 mm,

respectivamente; 512 x 368 pixels).

A varredura de campo amplo detectando os elétrons retroespalhados durou aproximadamente cerca de oito horas para completar a análise do espécimen (28 mm em comprimento e 10 mm em largura). Já para a detecção dos raios-X, a varredura teve cerca de 60 horas. Entretanto, como já foi citado em condições de baixo vácuo, a amostra sofre carregamento com o passar do tempo. Sendo assim, a varredura por completo foi dividida em intervalos de 15 horas, varrendo uma área aproximada de 5 x 5 mm em cada intervalo de tempo.

A primeira etapa para montagem das imagens de campo-amplo foi realizada no próprio *AZtec*, onde o *software* combina aproximadamente 280 imagens adjacentes, o equivalente a aproximadamente 5 x 5 mm da área do fóssil. Em seguida, a montagem foi realizada no *Adobe Photoshop*, reposicionando as áreas das imagens adjacentes, gerando uma sobreposição coerente ajustada, e depois um recorte que enfatizou a área da imagem composta pela impressão do fóssil. Por fim, o resultado das imagens de campo amplo correspondendo a área total do fóssil teve 5906 x 2119 *pixels* de tamanho, com uma resolução de 600 pixels inches⁻¹.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

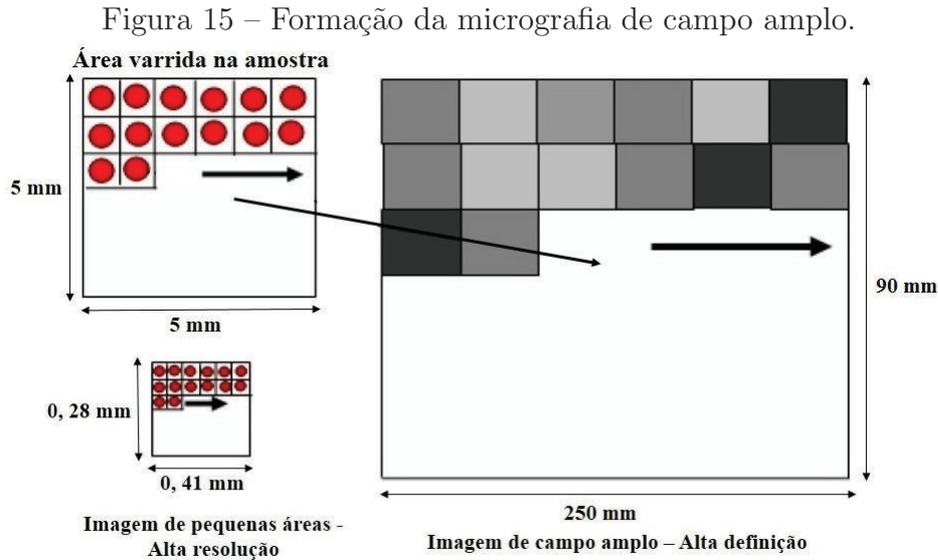
4.1 Avaliação Morfológica do Fóssil Através de Imagens de Campo Amplo de BSE

A espécime fóssil em estudo, possui cerca de 28 mm de comprimento e 10 mm de largura. A primeira análise do material encontrado nos folhelhos da Formação Ipubi, foi realizada em laboratório com um microscópio ótico. Durante a análise, foi constatada que a morfologia do fóssil é a de um camarão (crustáceo decápodo¹). Porém, a microscopia ótica não desvendou detalhes da morfologia do crustáceo que pudessem confirmar com exatidão a sua classificação. Em suma, a partir dessa falta de detalhes morfológicos por parte da microscopia ótica, buscou-se na microscopia eletrônica de varredura uma análise detalhada da espécie e conseqüentemente a confirmação da sua classificação.

O procedimento de varredura realizado no MEV proposto neste trabalho, é definido como uma varredura de campo amplo, onde a formação da imagem compreende toda a área do fóssil, e apresenta uma alta definição resultado da montagem de milhares de imagens da amostra. O desenvolvimento deste método de varredura ocorre com os sucessivos posicionamentos do estágio, dentro dos limites de marcação da área do fóssil.

Porém, mesmo a alta precisão mecânica de posicionamento disponível no microscópio, as imagens obtidas ainda apresentam uma defasagem de posicionamento em torno de 1% a 10%, o que acarreta uma montagem incoerente das imagens. Para solucionar essa falha no processo de montagem das imagens, um algoritmo de sobreposição do próprio *software* automatiza o processo sobrepondo um par de imagens de acordo com a sua distribuição bidimensional de valores de escala de cinza, ou seja, a compatibilidade é realizada em cada ponto no plano da imagem considerando seus valores na escala de cinza (variando de 0 a 1), onde o 0 se refere ao pixel preto e o 1 ao pixel branco. Este método foi capaz de montar mais de 3.600 micrografias eletrônicas, com campos horizontal e vertical com cerca de 0,41 mm e 0,28 mm de largura e de altura, respectivo a um campo de imagem de 512 x 368 pixels. A montagem final que compreende a área total do espécime possui cerca de 5906 x 2119 pixels, com 600 pixel inches⁻¹ de definição, distribuídos numa área de aproximadamente 280 mm² de tamanho, sendo que um pixel corresponde a 5 μm de tamanho da amostra. Ao decorrer da varredura de campo amplo dois sinais gerados foram conseqüentemente capturados pelos detectores do microscópio: os elétrons retroespalhados (BSE) e os raios-X emitidos.

¹Um dos critérios para classificação dos crustáceos é o seu número de patas, os decápodes possuem dez patas.



Fonte: Adaptada de HAFNER, 2015.

Legenda: Descrição do procedimento de varredura de campo amplo, desde a formação de apenas uma micrografia até a montagem da imagem de campo amplo, após as sobreposições coerentes.

Os elétrons retroespalhados em sua grande maioria são formados após colisões elásticas dos elétrons do feixe primário com os átomos do material, o que faz com que os elétrons emitidos pós-colisão possuam energia relativamente alta. Sendo assim, o detector de diodo de estado sólido do tipo GAD anular é fixado de maneira a facilitar a captura dos BSE, no final da peça polar, posicionado entre a lente objetiva e a superfície da amostra. Logo após atingir o detector, o sinal é manipulado e amplificado produzindo adequadamente as imagens.

A interpretação de imagens em escala de cinza requer uma compreensão da origem dos mecanismos de contraste. Sendo assim, a manipulação do sinal gerado pelos BSE resultou numa função contraste que se relaciona com as imagens aqui obtidas de duas formas, uma função contraste que fornece informações topográficas e outra função contraste que fornece informações composicionais. A função contraste é definida pela seguinte relação,

$$C = \frac{(S_2 - S_1)}{S_2} \quad (4.1)$$

sendo $S_2 \geq S_1$, onde S_1 e S_2 representam os sinais detectados em dois pontos quaisquer, escolhidos aleatoriamente na varredura que define o campo da imagem. A definição dessa característica como valor numérico ocorre para o ponto S_2 dentro da região de interesse e para o ponto S_1 em torno do primeiro, de maneira que C seja sempre positivo e restrito ao intervalo $0 \leq C \leq 1$. Para os casos extremos em que $C = 0$ o sinal é o mesmo para ambos os pontos, e para $C = 1$ é como se um objeto estivesse suspenso sobre um buraco, e os sinais emergissem do buraco e do objeto, de modo que $S_1 = 0$ e $S_2 = 1$. O conceito de

contraste e sua função numérica constituem um dos fatores básicos de maior importância na microscopia eletrônica de varredura [31].

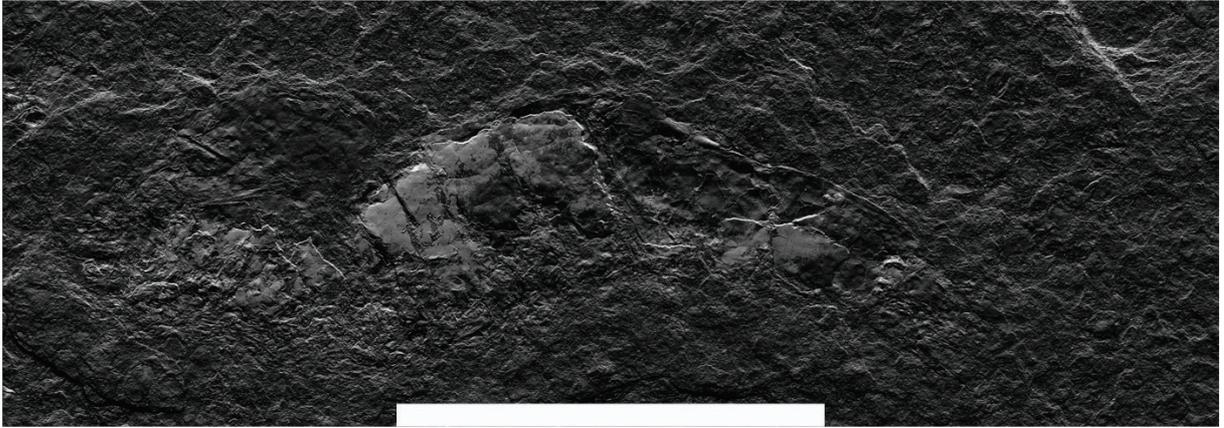
É importante ressaltar que essa função do campo de imagem depende de vários fatores decorrentes da interação elétron-amostra, por exemplo, das propriedades do espécimen (formato, composição, entre outros), do funcionamento do microscópio (a natureza do sinal emitido, a posição, a intensidade e a resposta dada pelo detector durante a interação). A função contraste, como já citada anteriormente, pode ser adquirida de diferentes formas, exemplo: através de diferenças no relevo da amostra (contraste topográfico), por meio da diferença dos números atômicos dos elementos constituintes da amostra (contraste composicional) e devido a densidade ou massa específica das fases da amostra (contraste de densidade).

Uma das principais contribuições do MEV está relacionada com o estudo de características superficiais, ou topografia de uma amostra. O contraste topográfico gerado por elétrons retroespalhados surge devido a dependência do número e da trajetória dos BSE em função do ângulo de incidência entre o feixe eletrônico e a superfície da amostra. Quanto mais inclinada a superfície do espécimen em relação ao feixe, maior será o coeficiente de retroespalhamento η (componente de número). Além do mais, a inclinação da superfície contribui também para a direcionalidade da retroespalhamento (componente de trajetória). O sinal dos BSE é manipulado com o intuito de fornecer uma função de contraste relacionada com a topografia da amostra (BSE T). Para isso subtraiu-se o sinal de BSE capturado em um quadrante do detector anular do sinal de BSE capturado na outra metade.

No contraste topográfico, os "topos" na superfície da amostra apresentam-se mais claros e os "vales" mais escuros. Estes aspectos estão diretamente relacionados com as componentes de número e de trajetória dos BSE, cujo caminho é a linha de visão com o detector. O sinal é preferencialmente obtido de regiões da superfície que são quase perpendiculares ao feixe, apresentando-se mais claras; já as regiões que apresentam inclinação apresentam-se mais escuras, pois os BSE provenientes dessas superfícies se dirigem para longe do detector. Em relação ao fósfil, pode-se observar na Figura 16 as diferentes funções contrastes usadas por topografia (BSE T). Como o fósfil do camarão apresenta uma superfície relativamente plana, o contraste topográfico não varia consideravelmente ao decorrer da imagem. Por outro lado, com a soma de ambos os sinais de BSE (dos dois quadrantes do detector) é gerada uma função de contraste composicional (BSE Z), contendo informação sobre a composição química dos elementos da região em estudo, ou seja, este tipo de mecanismo de contraste possui dependência no número atômico (Z). O contraste de composição transmite informações a partir da diferença de tonalidades, na

Figura 16 – Micrografia de campo amplo de elétrons retroespalhados evidenciando o contraste topográfico do fóssil. A barra de escala em branco corresponde a 10 mm.

(a) Imagem de campo amplo de BSE original, obtida no MEV sem manipulação.



(b) Imagem de campo amplo de BSE com manipulação. Foram feitos alguns ajustes de contraste e brilho na imagem através do software *Adobe Photoshop*.



Fonte: Elaborada pela autora.

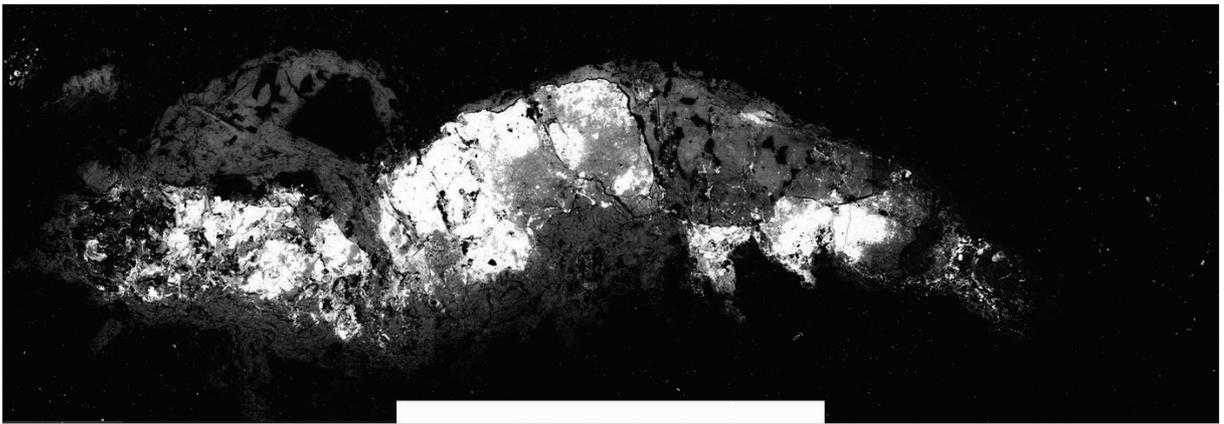
escala de cinza. A variação de tonalidades claras e escuras são frequentemente o resultado de diferenças na composição da amostra. O coeficiente de retroespalhamento (η) possui relação direta com o número atômico (Z): as regiões compostas por elementos químicos que possuem um alto Z se apresentam visivelmente mais claras na imagem, e as com baixo Z mais escuras. Isso ocorre devido a seção de choque σ dos átomos que compõem os elementos, quanto mais alto o número atômico do elemento, maior será a sua seção de choque, e conseqüentemente menor o livre caminho médio λ percorrido pelos elétrons, gerando um sinal mais intenso de BSE. Para a situação contrária, elementos com baixo Z possuem menor σ e por conseguinte maior λ , gerando um sinal menos intenso de BSE.

A função de contraste pode ser facilmente alterada, proporcionando mais informações sobre os diferentes aspectos composicionais da amostra. Sendo assim, foram geradas imagens de contraste composicional de BSE em baixo contraste (BSE Z LC), e em alto contraste (BSE Z HC), ver Figura 17. Na imagem de baixo contraste pode-se observar

a variação na escala de cinza, ou seja, a composição química apresenta fases distintas ao longo de toda a impressão do material fossilizado. Porém os contornos morfológicos não foram revelados com clareza, ver Figura 17a. Nas regiões com tonalidades próximas ao branco (ou seja, com valores próximos ao valor de 1 na escala de cinza) revelou áreas do fóssil que possuem elementos de alto número atômico na sua composição química. E as regiões em tonalidades de cinza revelaram parcialmente a morfologia do camarão impressa na matriz fossilizada.

Figura 17 – Micrografias de campo amplo de elétrons retroespalhados (BSE) evidenciando o contraste composicional do fóssil. A barra de escala em branco corresponde a 10 mm.

(a) Imagem de campo amplo de BSE, obtida no MEV em baixo contraste (BSE Z LC).



(b) Imagem de campo amplo de BSE, obtida no MEV em alto contraste (BSE Z HC).



Fonte: Elaborada pela autora.

Entretanto, amostras desse tipo apresentam uma grande quantidade de elementos químicos, neste caso em especial são dezesseis elementos (identificados posteriormente por EDS) e a interpretação dessas imagens de baixo contraste torna-se complexa sem a associação com os mapas elementares obtidos por EDS.

Para as imagens de BSE de alto contraste (ver Figura 17b), os contornos do fóssil foram revelados totalmente, apesar das informações referente as fases composicionais

do material fossilizado terem sido perdidas com o aumento do contraste. Comparando a fotografia do espécimen fossilizado ver Figura 18a, com a imagem de BSE de alto contraste (ver Figura 18b) observou-se a presença dos pleópodos², dos periópodos³, das antenas e antênulas (apresentam-se curvadas sobre a cabeça do camarão), da pleura abdominal, dos télsons e urópodos⁴ do camarão fossilizado, detalhes característicos da espécie que não foram reveladas pela microscopia ótica.

Figura 18 – Comparação entre a fotografia do espécimen de camarão fossilizado e a micrografia em alto contraste de campo amplo de elétrons retroespalhados (BSE).

(a)



(b)



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Em (a) a fotografia do espécimen de camarão fossilizado, e em (b) a imagem de campo amplo de elétrons retroespalhados em alto contraste (BSE Z HC), as imagens evidenciam as características morfológicas composicionais reveladas pela Microscopia Eletrônica de Varredura. A barra de escala em branco corresponde a 10 mm.

Expressando esses resultados das imagens de BSE de campo amplo em histo-

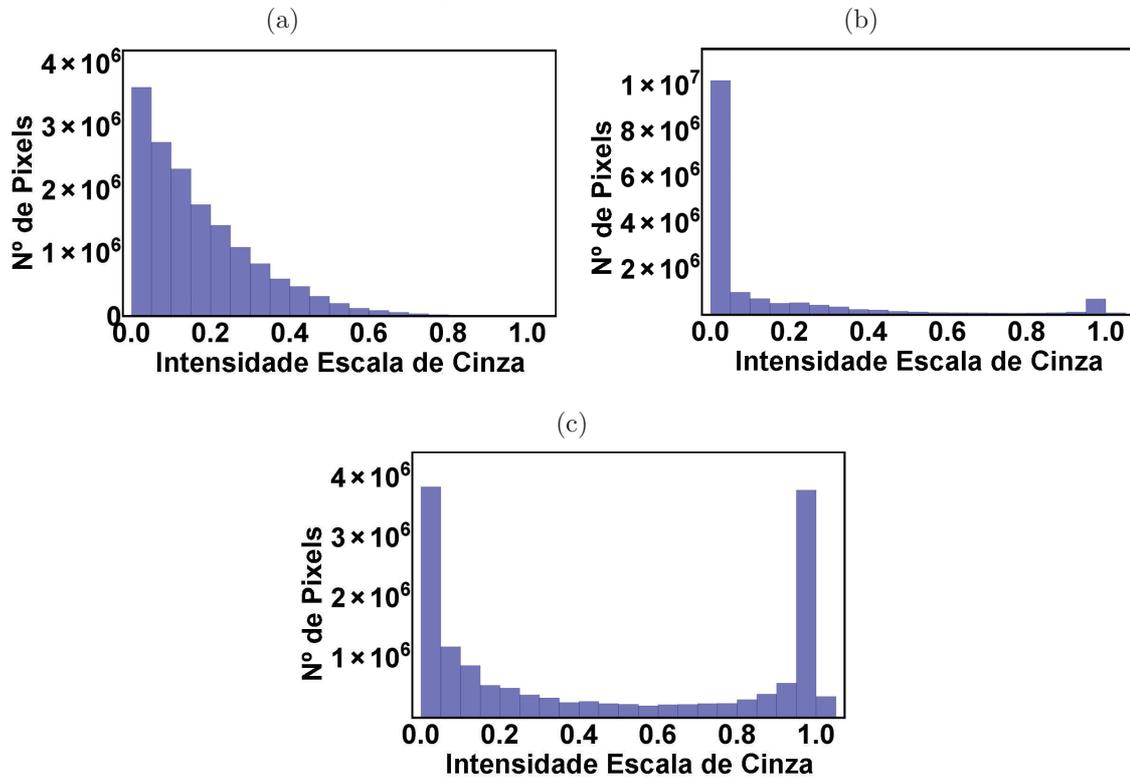
²Os pleópodos são os apêndices do camarão (pernas abdominais), que ajudam na respiração e no transporte do ovos nas fêmeas.

³A região torácica do camarão possui cinco pares de apêndices (pernas torácicas), os periópodos, que são usados para locomoção.

⁴O último dos segmentos do abdome é o télson e, ao lado dele, estão os urópodos.

gramas na escala de cinza, tem-se que para o contraste topográfico há uma diminuição progressiva do número de pixels pretos (intensidade zero) à tons de cinza (cerca de 0,6). A ausência de variações substanciais nos valores, ver Figura 19a, confirma o que foi visualizado na micrografia, pois esse resultado se deve ao fato da amostra possuir uma superfície bastante plana. Para a micrografia composicional de baixo contraste, apresenta-se uma grande quantidade de pixels escuros (aproximadamente 1×10^7 pixels pretos), ver Figura 19b, o que caracteriza regiões com composições distintas no fósfil. E, por conseguinte, para a micrografia composicional em alto contraste, a quantidade de tons mais claros aumentou, resultando num equilíbrio entre os pixels preto e branco ao longo do campo da imagem (ou seja, aproximadamente 3×10^6 pixels para ambos, ver Figura 19c, revelando parcialmente a morfologia do fósfil impressa na matriz.

Figura 19 – Histogramas dos valores na escala de cinza



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Os histogramas evidenciam: em (a) o contraste topográfico da micrografia de campo amplo (BSE T), em (b) o contraste composicional da micrografia de campo amplo (BSE Z) em baixo contraste e em (c) o contraste composicional da micrografia de campo amplo (BSE Z) em alto contraste.

4.2 Avaliação Composicional Através de Mapas Elementares de Campo Amplo

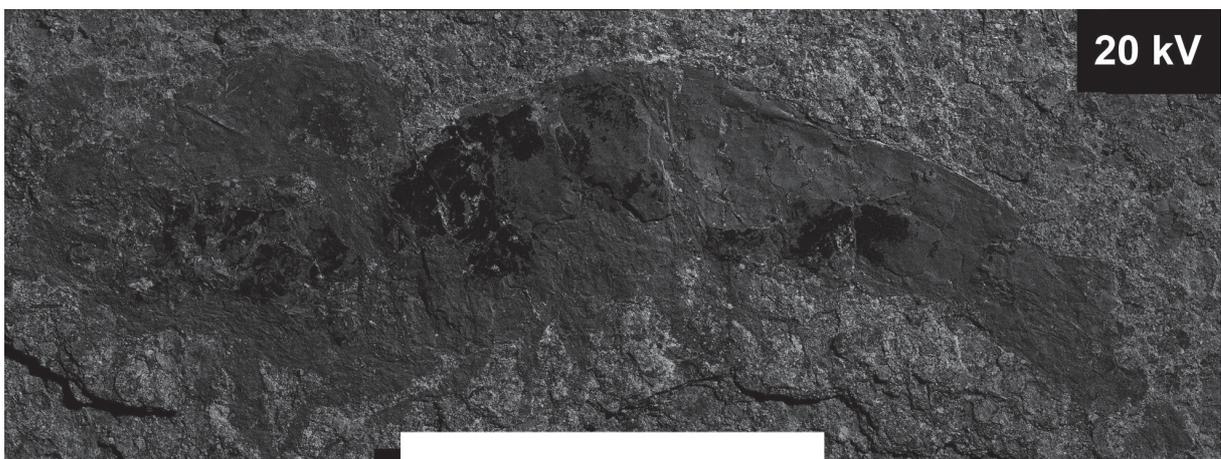
Simultaneamente, na varredura de campo amplo foram detectados tanto elétrons retroespalhados como também os raios-X emitidos pela amostra, devido ao processo de ionização resultante da interação dos elétrons do feixe com os átomos da amostra. Como já discutido anteriormente no Capítulo 3, a tensão de aceleração do feixe de elétrons aqui utilizada foi testada entre 5 kV e 20 kV. Tomando os efeitos causados pelas tensões de 5 kV e de 20 kV na construção dos mapas elementares (ver Figura 20), tem-se algumas considerações. Para a varredura de campo amplo com o feixe de elétrons acelerado a 5 kV, as imagens produzidas apresentaram um sinal mais ruidoso quando comparadas com as imagens produzidas a 20 kV.

Figura 20 – Imagens dos mapas elementares de oxigênio do fóssil obtidos com tensões variadas, (a) a 5 kV e (b) a 20 kV. A barra de escala em branco corresponde a 10 mm.

(a)



(b)



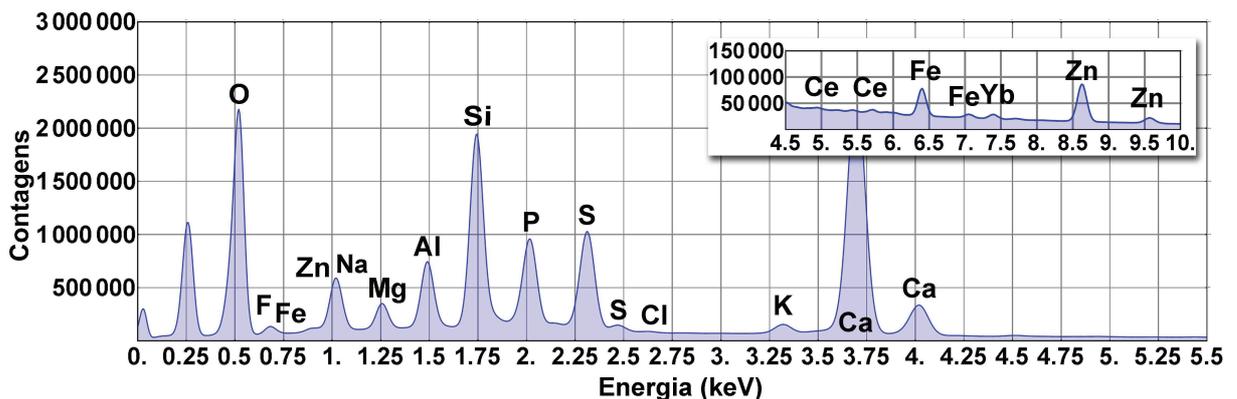
Fonte: Elaborada pela autora.

Ambas varreduras tiveram o mesmo tempo de permanência do feixe sobre a

amostra ($60 \mu\text{s}$ por pixel). Portanto, o efeito ocorre por que a penetração do feixe de elétrons na amostra é diretamente proporcional a aceleração de tensão do feixe primário, os mapas elementares construídos a 20 kV (ver Figura 20b) apresentaram mais informações elementares do fóssil, e menor razão sinal-ruído.

A análise química da amostra em estudo foi realizada avaliando-se a distribuição de energia e a intensidade dos sinais de raios-X gerados. Esses sinais são processados e identificados a partir da energia dos raios-X (espectro de energia), ou seja, a energia específica de cada um dos fótons emitido pela amostra. O espectro de EDS gerado pela soma acumulativa de todos os espectros (mais de 3.600) obtidos durante a varredura de campo amplo está representado na Figura 21. Os mapas elementares foram processados filtrando os sinais de raios-X através de um *gap* de energia⁵ de 80 eV no espectro de EDS (resolução espectral de aproximadamente 5 eV), centrado na energia associada à máxima dos picos de cada elemento no espectro EDS (ver Figura 21).

Figura 21 – Espectro de energia dispersiva por raios-X (EDS) para a área completa de fóssil, produzido a partir da varredura de campo amplo, soma de mais de 3.600 espectros.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os mapas elementares de campo amplo dos elementos com concentração relativa (em massa) acima de 1% foram construídos a partir de transições eletrônicas $K\alpha$ ⁶. Esse tipo de transição corresponde à transição mais provável de acontecer para um átomo com ionização na camada K. O estado de vacância eletrônica para essa transição pertence a camada mais interior (camada K), e a quantidade de energia a ser liberada do átomo durante o preenchimento dessa vacância pelo elétron da próxima camada (camada L) é positiva.

Foram identificados por meio do espectro acumulativo de EDS de toda a área do camarão dezesseis elementos químicos, citados aqui em ordem crescente de suas massas

⁵O *gap* de energia é dado por uma "quantidade" de energia necessária ao elétron, de forma que este passe da banda de valência para a banda de condução.

⁶O relaxamento do átomo após a ionização é realizado devido as transições dos elétrons de uma camada para outra. A transição $K\alpha$ corresponde a transição de um elétron da camada L para a camada K.

atômicas (g mol^{-1}) (ver Tabela 1): **oxigênio** (O), **flúor** (F), **sódio** (Na), **magnésio** (Mg), **alumínio** (Al), **silício** (Si), **fósforo** (P), **enxofre** (S), **cloro** (Cl), **potássio** (K), **cálcio** (Ca), **titânio** (Ti), **ferro** (Fe), **zinco** (Zn), **cério** (Ce) e **itérbio** (Yb).

Tabela 1 – Elementos químicos identificados por meio dos espectros acumulativos de EDS, obtidos durante a varredura de campo amplo de toda área do material fossilizado.

Elemento	MA(g mol^{-1})	% em massa ^a	CMRN ^b
O	15.99	42.9	3759.3
F	18.99	2.3	169.7
Na	22.99	0.6	36.6
Mg	24.30	1.6	92.3
Al	26.98	3.5	181.8
Si	28.08	9.4	469.1
P	30.97	5.2	235.3
S	32.06	5.9	257.9
Cl	35.45	0.1	4.0
K	39.09	0.7	25.1
Ca	40.07	21.5	751.8
Ti	47.86	0.1	2.9
Fe	55.84	1.3	32.6
Zn	65.38	4.5	96.4
Ce	140.12	0.1	1.0
Yb	173.05	0.3	2.4

^a% em massa dos valores obtidos após o cálculo da concentração relativa de elemento pelo *software* (método *standardless*), após a correlação dos valores relativos, e a normalização de todos os picos de intensidade (para 100%).

^ba concentração molar relativa normalizada (CMRN, em unidades molares) foi calculada dividindo-se cada valor da % em massa pela massa atômica (g mol^{-1}) de cada elemento e, em seguida, a normalização dos resultados foi feita a partir do elemento presente em menor quantidade.

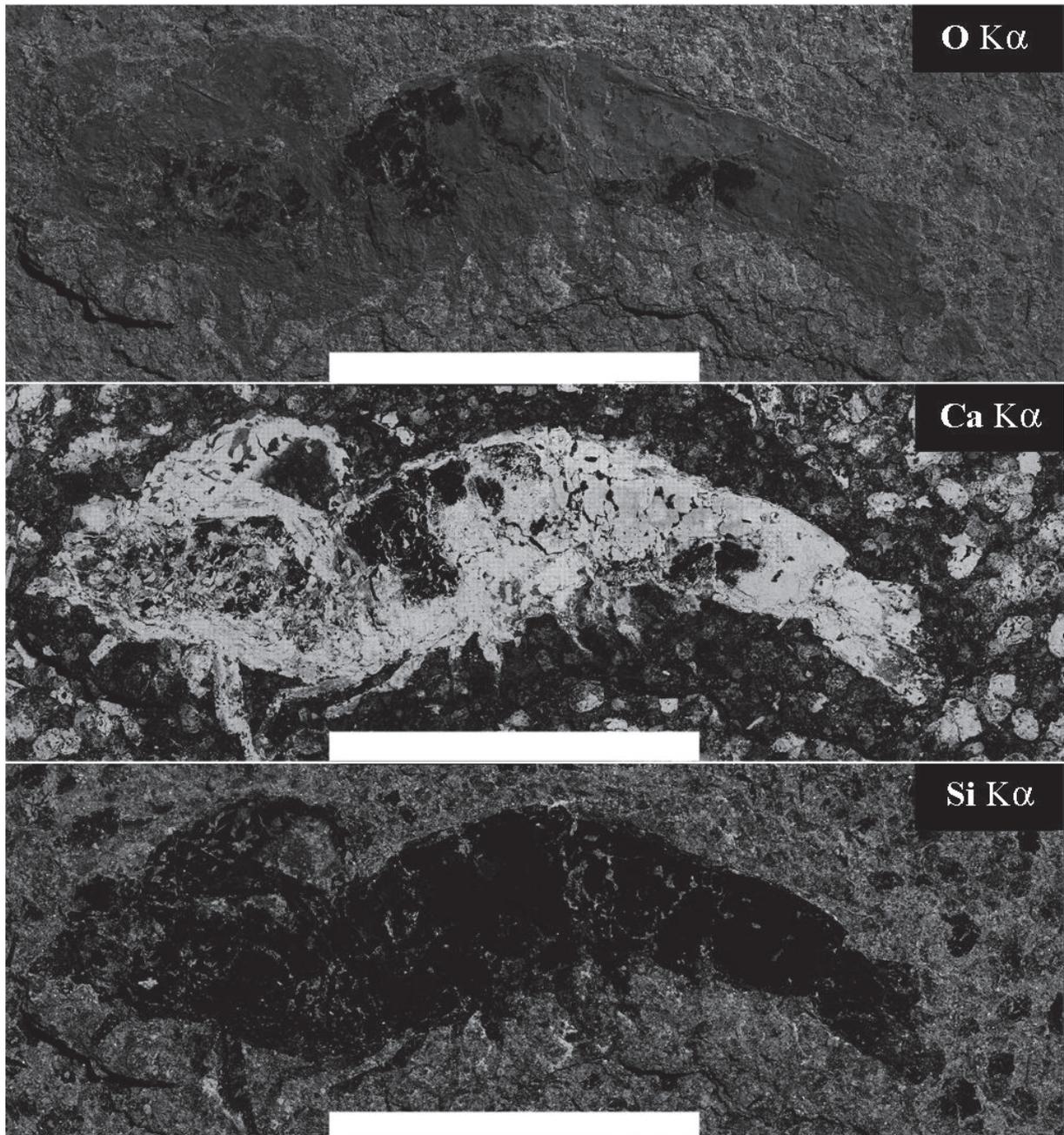
Fonte: Elaborada pelo autora.

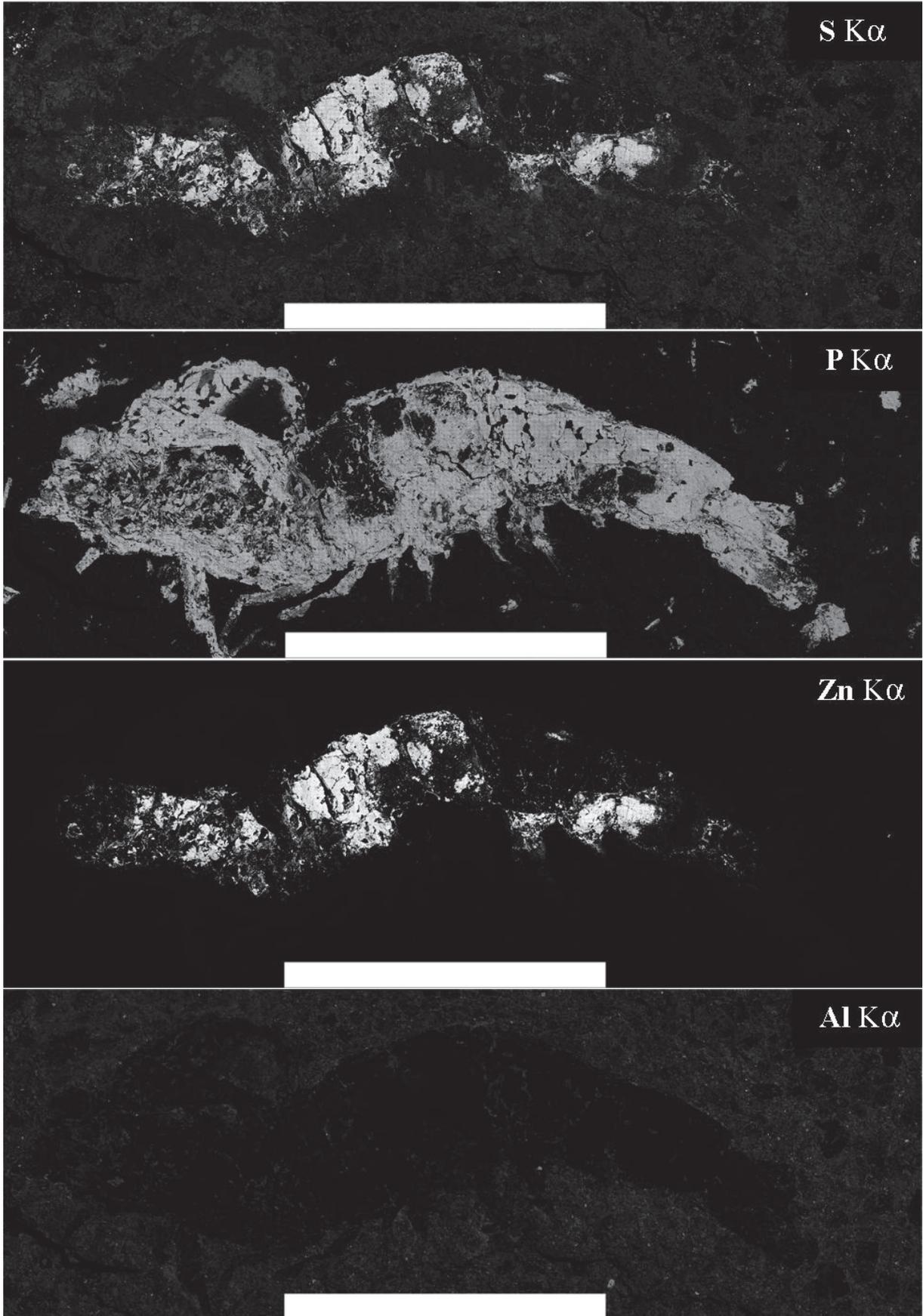
A interpretação composicional do fóssil do camarão só foi realizada devido à associação dos mapas elementares (ver Figura 22). Os mapas estão representados de cima para baixo em função de suas concentrações relativas (% em massa), de acordo com a Tabela 1.

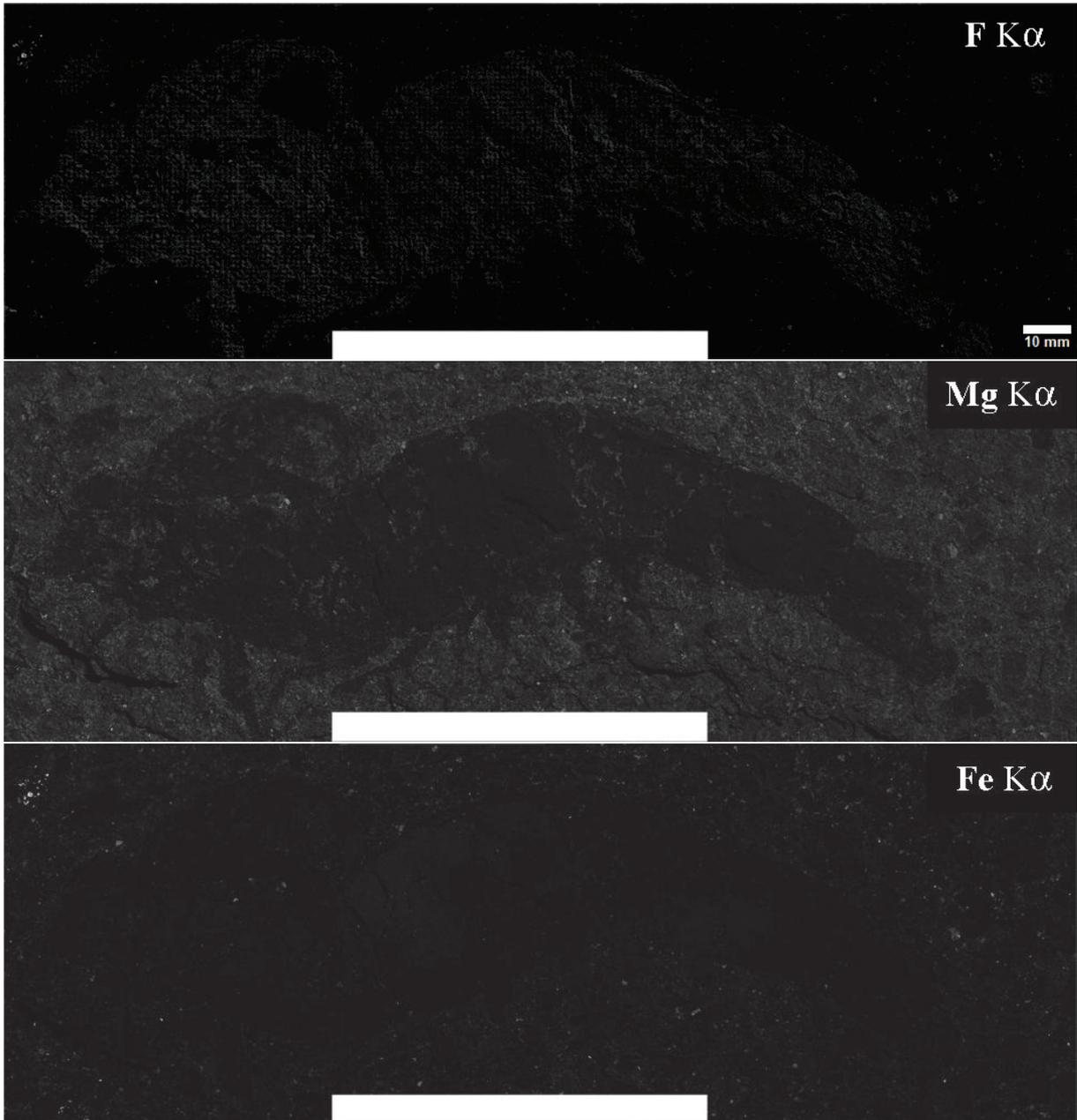
O sinal do elemento químico carbono (C), apesar de não estar incluído nos mapas elementares e nem nos cálculos das concentrações relativas de massa atômica da amostra, não pode deixar de ser citado aqui. A exclusão se dá ao fato de que o carbono pode ser detectado em função de uma possível contaminação ocorrida durante o manuseio do material fóssil. Vale ressaltar que essa exclusão não conduziu a nenhum reflexo

nas interpretações quantitativas aqui efetuadas para os outros elementos, pois elas foram efetuadas tomando como base somente as concentrações relativas de massa dos elementos (em unidade molar). No fóssil, o carbono é associado principalmente aos carbonatos de cálcio (CaCO_3), ou calcita [5].

Figura 22 – Mapas elementares de campo amplo dos elementos químicos que compõem a amostra de camarão fossilizado.





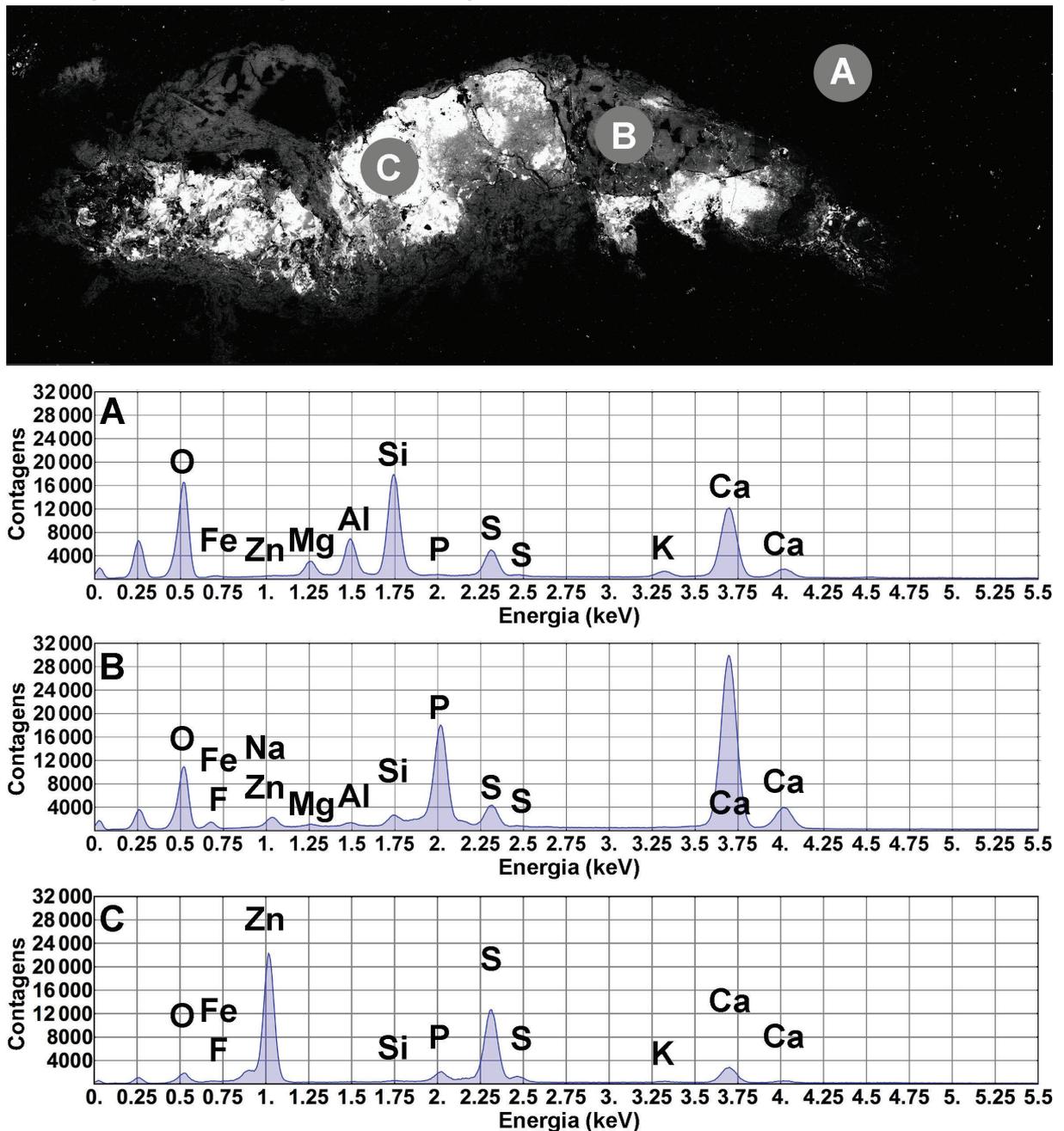


Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Apenas os elementos com quantidades maiores que 1,0% em massa estão representados. A barra de escala em branco corresponde a 10 mm.

Analisando a imagem composicional de campo amplo do fóssil, ver Figura 23, nota-se que existem três regiões características: a matriz do fóssil (**região A**) composta principalmente pelos elementos O, Si, Ca, S, Al, Mg e F; uma região rica em fósforo (**região B**) composta por O, Ca, P, F, S e Na; e finalmente uma região composta principalmente por S e Zn (**região C**).

Figura 23 – Micrografia com as regiões características do espécimen fossilizado.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Micrografia de campo amplo de BSE de baixo contraste identificando as regiões características definidas como (A) matriz do fóssil, (B) área do fóssil rica em fósforo e (C) área rica em enxofre e zinco. São mostrados também os respectivos espectros de EDS para cada região característica.

O cálculo da concentração molar relativa para todos os elementos identificados nos espectros acumulativos de EDS das regiões A, B e C estão representados na Tabela 2. A interpretação da microanálise de raios-X é feita através dos espectros, e esses fornecem uma base de dados que contém para cada elemento químico as energias e as intensidades das linhas que as produziram. Os elementos com concentrações relativas menores que 1,0%

foram identificados somente no espectro acumulativo do EDS porém, suas interpretações quantitativas não são válidas. Este é o caso do cloro (Cl), potássio (K), titânio (Ti), cério (Ce) e itérbio (Yb), neste contexto todos são considerados elementos traços.

Tabela 2 – Elementos químicos identificados por meio dos espectros de EDS de regiões específicas do fóssil (ver Figura 23), caracterizados de acordo com as regiões A, B e C.

Elemento	A ^a			B ^b		C ^c	
	MA (g mol ⁻¹)	% em massa ^d	CMRN ^e	% em massa ^d	CMRN ^e	% em massa ^d	CMRN ^e
O	15.99	48.9	487.9	40.3	985.2	6.5	45.4
F	18.99	<i>f</i>	<i>f</i>	5.6	115.3	0.2	1.2
Na	22.99	<i>f</i>	<i>f</i>	1.6	27.2	<i>f</i>	<i>f</i>
Mg	24.30	2.1	13.8	0.4	6.4	0.3	1.4
Al	26.98	5.1	30.2	0.5	7.2	0.6	2.5
Si	28.08	14.8	84.1	1.3	18.1	1.2	4.8
P	30.97	0.2	1.0	11.7	147.7	0.8	2.9
S	32.06	6.2	30.9	3.2	39.0	28.0	97.5
Cl	35.45	<i>f</i>	<i>f</i>	0.2	2.2	<i>f</i>	<i>f</i>
K	39.09	1.2	4.9	0.1	1.0	0.4	1.1
Ca	40.07	18.6	74.1	33.6	327.8	3.1	8.6
Ti	47.86	0.3	1.0	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>f</i>
Fe	55.84	2.6	7.4	0.2	1.4	0.5	1.0
Zn	65.38	<i>f</i>	<i>f</i>	1.3	7.8	58.4	99.8
Ce	140.12	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>f</i>
Yb	173.05	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>f</i>

^aa região A possui indícios da formação de gipsita [Ca(SO₄)2H₂O], aluminossilicatos (Al₂SiO₅) e carbonatos (CO₃⁻²) na sua composição.

^ba região B possui indícios da formação de hidroxiapatita [Ca₅(PO₄)₃OH] e fluorapatita [Ca₅(PO₄)₃F] na sua composição.

^ca região C possui indícios de pirita (FeS₂) e sulfeto de zinco (ZnS) na sua composição.

^d% em massa dos valores obtidos após o cálculo da concentração de elemento pelo software (método *standardless*) e a correlação de valores relativos e normalização de todos os picos em função da intensidade.

^ea concentração molar relativa normalizada (CMRN, em unidades molares) foi calculada dividindo-se cada valor da % em massa pela massa atômica (g mol⁻¹) de cada elemento e, em seguida, promoveu-se a normalização dos resultados no que se refere ao elemento presente em menor quantidade.

^felementos traços detectados e quantificados apenas através do espectro acumulativo gerado ao longo da varredura de campo grande, no qual foram somados aproximadamente 3.600 espectros; tendo assim, a sensibilidade melhorada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Quanto aos fósseis anteriormente estudados da Formação Ipubi [41], eram primordialmente impressões de fósseis encontrados entre folhelhos escuros ricos em matéria orgânica e sulfatos de cálcio (CaSO₄). Tanto o fósforo como o cálcio estão traçados nos mapas elementares (mineralizados como hidroxiapatita [Ca₅(PO₄)₃OH], ver os mapas dos respectivos elementos na Figura 22), e a presença desses elementos faz com que a morfologia do camarão seja melhor compreendida. Por exemplo, detalhes como o abdômem, a carapaça parcialmente preservada, partes dos pleópodos e outros apêndices cefálicos (ou seja, antenas e antênulas) puderam através deles serem observados. Nestes mapas

também foi possível observar a descrição de outras estruturas morfológicas do fóssil como: apêndices torácicos (pereópodos), pleura abdominal de somitos, e novos detalhes dos pleópodos, urópodos e telsons. Não houve preservação dos espinhos rostrais e também observou-se que parte das antenas e das antênulas estavam curvadas para cima, sobre o cefalotórax.

Comparando o mapa do fósforo com o mapa do flúor (ver mapas na Figura 22), observa-se que o fósforo está presente dentro dos limites do camarão, assim como o mapa do flúor. Isto é, em grande parte, o mapa do flúor se sobrepõem ao mapa do fósforo. Além disso, a presença do flúor nos espectros da região C em uma razão molar em torno de 1:3 em relação ao fósforo (ver Tabela 2) leva-se à proposta de que pode haver a substituição parcial do grupo hidroxila (OH) da hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$ pelo flúor (F), resultando em $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}_{(1-x)})\text{F}_x]$. Sendo assim, conclui-se que uma substituição total pode conduzir à formação da fluorapatita, ou seja, $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}]$. A fluorapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}]$ pode prover ao fóssil maior estabilidade química e uma maior resistência à dissolução, uma vez que as partes mais mineralizadas da amostra tendem a ter um acúmulo de flúor [42, 43].

Outra importante conclusão ainda da região C foi estabelecida considerando a sobreposição dos mapas elementares do zinco e do enxofre (ver Figura 22). Tomando as concentrações molares relativas normalizadas (NRMCM) dos espectros obtidos na região, tem-se a razão aproximada de 1:1, ou seja, 97,5 mol de enxofre para 99,8 mol de zinco (ver Tabela 2), o que confirma a presença de sulfeto de zinco (ZnS) no fóssil. Valer considerar também, a possível presença de $[(\text{Zn},\text{Fe})\text{S}]$ (wurtzita ou esfalerita) e piritita (FeS_2), mesmo que em menor quantidade, pois há uma sobreposição do Fe, Zn e S nos mapas elementares. Entretanto, a concentração molar relativa normalizada do Fe apresenta valor muito baixo em relação ao Zn e ao S (razão de 1:10, ver Tabela 2), o que indica uma incidência baixa dessas duas fases mencionadas. Há de se considerar o enxofre aparecendo em outras composições como os sulfatos (por exemplo, $[\text{Ca}(\text{SO}_4)\cdot\text{H}_2\text{O}]$) na região C. Porém, seu mapa elementar não se sobrepõem ao mapa do oxigênio (ver Figura 22), o que descarta a possibilidade da presença de sulfatos em grandes quantidades. Outra maneira de se observar esse aspecto é por meio do cálculo da razão molar nos espectros (valor aproximado de 2:1 para o enxofre: oxigênio, ver Tabela 2). Esse fato embasa a ocorrência de uma maior precipitação de sulfeto de zinco (ZnS). O processo de fossilização através da mineralização de piritita na Bacia Sedimentar do Araripe [41] já tinha sido anteriormente observado, enquanto que o processo de mineralização através da formação de sulfeto de zinco (ZnS) teve sua primeira observação no desenvolver do presente trabalho.

A mineralização de sulfetos de zinco (ZnS) em fósseis, aparentemente como

esfalerita ou wurtzita [(Fe,Zn)S] em restos biogênicos pode surgir na forma de moldes internos, ou seja, como preenchimento de vazios em esqueletos e também como substituintes de materiais no esqueleto dos organismos [44,45]. A formação desse composto químico tem sido observada principalmente em fósseis de nascentes de água quente, isto é, em regiões com fontes hidrotermais, distribuídas ao longo das cristas dos cumes vulcânicos [46–48]. Fósseis destas regiões foram formados da fauna comumente encontrada como grandes moluscos, vermes, caranguejos, e uma variedade de peixes [49,50]. O processo de fossilização por (ZnS) nestes fósseis possui relação com a acidificação da solução e com a presença de sulfeto de hidrogênio [51], que, conseqüentemente, induziu a precipitação do sulfeto de zinco [49,50].

Dessa forma, a presença desses dois elementos químicos, o enxofre (S) e o zinco (Zn) em fósseis se revela como um raro e limitado evento. No caso de gastrópodes, por exemplo, a ocorrência de (ZnS) está relacionada com o acúmulo de zinco durante a vida dos organismos, permitindo que ocorra no ambiente a formação do sulfeto de zinco após as suas mortes [45]. Fazendo um paralelo com o fóssil do camarão em estudo, pode-se levar em consideração que a presença de Zn também esteja atribuída a um processo de acúmulo do elemento durante a vida do organismo. Entretanto, estudos toxicológicos modernos apontam para o fato de que camarões não são uma armadilha eficiente para o Zn [52,53], como são os gastrópodes [52–57], e os primeiros são também capazes de regular seus níveis totais de zinco no corpo [57]. Mesmo com todos os fatores convergindo para tal origem do zinco no camarão, não se deve excluir a possibilidade do Zn ter sido originado de outra maneira, tal como uma alta concentração de zinco na água do ambiente em que o animal vivia. Contudo, o mapa elementar do zinco (ver Figura 22) remete a atenção de que esse elemento se faz presente apenas nos contornos do fóssil, e então seria pouco provável a última hipótese ser tomada como verdade, pois o zinco deveria apresentar um homogeneidade no fóssil como um todo.

O processo de formação do composto (ZnS) em si denota muita complexidade, como enfatizado para o caso dos gastrópodos [53]. Em resumo, no mínimo duas possibilidades para essa formação desse processo de fossilização foram encontradas: a primeira faz referência ao enchimento das camadas de carbonato (CO_3^{-2}) por (ZnS) e a outra ao enchimento das camadas de carbonato (CO_3^{-2}) por calcita (CaCO_3) e/ou pirita (FeS_2), substituindo-se posteriormente estes materiais por esfalerita ou wurtzita [(Fe,Zn)S] [45]. De fato, em culturas de bactérias redutoras de sulfatos cultivadas em meios contendo ($\text{ZnSO}_4/\text{FeSO}_4$) observou-se que ocorre precipitação de (ZnS), mas não ocorre a precipitação de sulfetos de ferro (pirita, FeS_2) [58]. Essa informação revela que o enchimento das camadas de carbonato (CO_3^{-2}) no fóssil do camarão pode acontecer de maneira se-

melhante ao processo das bactérias. De acordo com os dados quantitativos, pode-se comprovar que a massa relativa do Fe (ver Tabela 2), é encontrada em apenas cerca de 0,5% na região do fóssil na qual o sulfeto de zinco (ZnS) se faz presente.

Contudo, não se pode ainda descartar em absoluto o outro mecanismo de precipitação de (ZnS), calcita (CaCO_3) e pirita (FeS_2). Na literatura existem trabalhos que comprovaram que o processo de fossilização na Formação Ipubi também acontecem por meio de piritização (FeS_2) [41]. Portanto, conclui-se que a hipótese de formação de (ZnS) é apenas uma outra possibilidade de fossilização encontrada na Formação Ipubi, da mesma maneira que ocorre para os gastrópodos [45], onde o animal é preenchido por calcita (CaCO_3) e sulfetos de ferro (FeS) e após isso os moldes de calcita (CaCO_3) são preenchidos por esfarelita ou wurtzita [(Fe,Zn)S].

REFERÊNCIAS

- [1] CASSAB, R.C.T. Objetivos e Princípios. In: Carvalho, I.S. (ed). **Paleontologia**. Rio de Janeiro: Interciência – cap 1, v. 1, p. 3-11, 2004.
- [2] CARVALHO, M. S. S., SANTOS, M. E. C. M. **Histórico das Pesquisas Paleontológicas na Bacia do Araripe, Nordeste do Brasil**. Anuário do Instituto de Geociências - UFRJ, v. 28-1, p. 15-34, 2005.
- [3] BOAS, M. V., BRILHA, J. B. R., LIMA, F. F. **Conservação do patrimônio paleontológico do Geopark Araripe (Brasil): enquadramento, estratégias e condicionantes**. Boletim Paranaense de Geociências, v. 70, p. 156 - 165, 2013.
- [4] SARAIVA, A. A. F., HESSEL, M. H. H., GUERRA, N. C. G., FARA, E. **Concreções Calcárias da Formação Santana, Bacia do Araripe: Uma proposta de classificação**. Estudos Geológicos - UFPE, v. 17-1, p. 40-57, 2007.
- [5] FILHO, F. E. S., **Aplicação de Técnicas Físicas na Paleontologia: Um estudo de Fósseis da Formação Ipubi - Bacia Sedimentar do Araripe**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- [6] ARRUDA, K. E. C., **Geodiversidade do Município de Araripina - PE, Nordeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2013.
- [7] BRUSCA, R., BRUSCA, G. **Invertebrados**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2007.
- [8] VIEIRA, I.M., NETO, M. **Aspectos da Socioeconomia dos Pescadores de Camarão da Ilha do Pará (PA) e Arquipélago do Bailique (AP)**. Boletim do Laboratório de Hidrobiologia - UFMA, v. 19, p. 85-94, 2006.
- [9] FELDMANN, R.M., POLEE, M. **A New Species of Paranephrops White, 1842: A Fossil Freshwater Crayfish (Decapoda: Parastacidae) From The Manuhirikia Group (Miocene), Central Otago, New Zealand**. New Zealand Journal of Geology and Geophysics, v. 37, p. 163-167, 1994.
- [10] THOMAS, D. B., NASCIMBENE, P. C., DOVE, C. J., GRIMALDI, D. A. & JAMES, H. F. **Seeking carotenoid pigments in amber-preserved fossil feathers**. Sci. Rep., v. 4, 5226; DOI:10.1038/srep05226, 2014.
- [11] CASTANHINHA, R. et al. **Bringing dicynodonts back to life: paleobiology and anatomy of a new emydopoid genus from the Upper Permian of Mozambique**. PLoS One, v. 8, e80974; DOI:10.1371/journal.pone.0080974, 2013.
- [12] HOUSSAYE, A. et al. **Three-dimensional pelvis and limb anatomy of the Cenomanian Hind-Limbed snake Eupodophis descouensi (squamata, ophidia) revealed by synchrotron- radiation computed laminography**. J. Vertebr. Paleontol., v. 31, p. 2–7, 2011.

- [13] THOMAS, D. B. et al. **Raman spectroscopy of fossil bioapatite — A proxy for diagenetic alteration of the oxygen isotope composition.** *Journal Palaeo*, v. 310, p. 62–70, 2011.
- [14] THOMAS, D. B. et al. **Molecular characterization of fossil palynomorphs by transmission micro-FTIR spectroscopy: Implications for hydrocarbon source evaluation.** *Journal of Coal Geology*, v. 115, p. 13–23, 2013.
- [15] LI, J. et al. **Impact of biomineralization on the preservation of microorganisms during fossilization: An experimental perspective.** *Earth Planet. Sci. Lett.*, v. 400, p. 113–122, 2014.
- [16] MATZKE-KARASZ, R. et al. **Subcellular preservation in giant ostracod sperm from an early Miocene cave deposit in Australia.** *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, v. 281, 20140394; DOI:10.1098/rspb.2014.0394, 2014.
- [17] RIQUELME, F. et al. **Insights into molecular chemistry of Chiapas amber using infrared-light microscopy, PIXE/RBS, and sulfur K-edge XANES spectroscopy.** *Appl. Phys. A*, v. 116, p. 97–109, 2014.
- [18] COSMIDIS, J. et al. **Nanometer-scale characterization of exceptionally preserved bacterial fossils in Paleocene phosphorites from Ouled Abdoun (Morocco).** *Geobiology*, v. 11, p. 139–53, 2013.
- [19] SCHWEITZER, M. H. et al. **A role for iron and oxygen chemistry in preserving soft tissues , cells and molecules from deep time.** *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, v. 281, 20132741; DOI: 10.1098/rspb.2013.2741, 2014.
- [20] MA, X., HOU, X., EDGECOMBE, G. D. & STRAUSFELD, N. J. **Complex brain and optic lobes in an early Cambrian arthropod.** *Nature*, v. 490, p. 258–261, 2012.
- [21] MA, X., CONG, P., HOU, X., EDGECOMBE, G. D. & STRAUSFELD, N. J. **An exceptionally preserved arthropod cardiovascular system from the early Cambrian.** *Nat. Commun.*, v. 5, 3560; DOI:10.1038/ncomms4560, 2014.
- [22] DA SILVA, J. H. et al. **Spectroscopic analysis of a theropod dinosaur (Reptilia, Archosauria) from the Ipubi Formation, Araripe Basin, Northeastern Brazil.** *J. Spectrosc.* 2013, p. 1–7, 2013.
- [23] ANTONIETTO, L. S. et al. **Taxonomy, ontogeny and paleoecology of two species of Harbinia TSAO, 1959 (Crustacea, Ostracoda) from the Santana Formation, lower Cretaceous, northeastern Brazil.** *J. Paleontol.*, v. 86, p. 659–668, 2012.
- [24] MARTILL, D. M. **The age of the Cretaceous Santana Formation fossil Konservat Lagerstätte of north-east Brazil: a historical review and an appraisal of the biochronostratigraphic utility of its palaeobiota.** *Cretac. Res.*, v. 28, p. 895–920, 2007.
- [25] FREIRE, P. T. C. et al. **Vibrational spectroscopy and X-ray diffraction applied to the study of Cretaceous fish fossils from Araripe Basin, Northeast of Brazil.** *J. Raman Spectrosc.*, v. 45, p. 1225–1229, 2014.

- [26] FARA, E. et al. **Controlled excavations in the Romualdo Member of the Santana Formation (Early Cretaceous, Araripe Basin, northeastern Brazil): stratigraphic, palaeoenvironmental and palaeoecological implications.** *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*, v. 218, p. 145–160, 2005.
- [27] PINHEIRO, A. P., SARAIVA, A. Á. F. & SANTANA, W. **Shrimps from the Santana Group (Cretaceous: Albian): new species (Crustacea: Decapoda:Dendrobranchiata) and new record (Crustacea:Decapoda:Caridea).** *An. Acad. Bras. Cienc.*, v. 86, p. 663–670, 2014.
- [28] MENON, F. & MAKARKIN, V. N. **New fossil lacewings and antlions (Insecta, Neuroptera) from the lower Cretaceous Crato Formation of Brazil.** *Palaeontology*, v. 51, p. 149–162, 2008.
- [29] LIMA, R. J. C., FREIRE, P. T. C., SASAKI, J. M., SARAIVA, A. A. F., LANFREDI, S., NOBRE, M. A. L. **Estudo de coprólitos da Bacia sedimentar do Araripe por meios de espectroscopia FT-IR e difração de raios-X.** *Química Nova*, v. 30, p. 1956–1958, 2007.
- [30] WILLIAMS, D. B., CARTER, C. B. **Transmission Electron Microscopy A Textbook for Materials Science.** New York: Springer Science + Business Media, 2009.
- [31] GOLDSTEIN, J. I., NEWBURY, D. E., JOY, D. C., LYMAN, C. E., ECHLIN, P., LIFSHIN, E., SAWYER, L., MICHAEL, J. R.; **Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis.** New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.
- [32] GALLEGO, J. **Microscopia Eletrônica de Varredura.** <http://www.dem.feis.unesp.br/maprotec/edu/mev.shtml>. Acessado em 17/04/2015.
- [33] REIMER, L. **Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis.** 2. ed. New York: Springer, 1998.
- [34] REED, S. J. B. **Electron Microprobe Analysis and Scanning Electron Microscopy in Geology.** 2. ed. New York: Cambridge University Press, 2005.
- [35] MANNHEIMER, W. A., SCHMIDT, P. F., VOORT, G. F. V., WILLIAMS, D. B. **Microscopia dos Materiais.** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2002.
- [36] DURA, M.F.R. **El ciclo biológico de los camarones peneidos.** *Técnica Pesquera*, v. 5, p. 12-15, 1985.
- [37] SILVA, O. **Alguns peneideos e palinurideos do Atlântico Sul.** *Superintendência de Desenvolvimento da Pesca (SUDEPE) Ministério da Agricultura, Brasil* 1, v. 20, 1965.
- [38] DUFEEK, M. **User Operation Manual.** 7. ed. FEI company, 2013.
- [39] HINRICHS, R. **Técnicas Instrumentais Não Destrutivas Aplicadas a Gemas do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: IGEO/UFRGS, 2014.

- [40] HAFNER, B. **Scanning Electron Microscopy Primer**. <http://www.charfac.umn.edu/>. Acessado em 17/04/2015.
- [41] FREIRE, P. T. C. et al. in **Pyrite: Synthesis, Characterization and Uses**. (ed. Whitley, N. & Vinsen, P. T.), Nova Science Publishers, p. 123–140, 2013.
- [42] SNIOSZEK, M., TELESINSKI, A., MUSIK, D. & ZAKRZEWSKA, H. **Comparative analysis of fluoride content in sheep mandibles from archeological excavations in Szczecin according to individual age and time of being deposited in soil**. *J. Elem.*, v. 13, p. 675–684, 2008.
- [43] GRYNPAS, M. D. **Fluoride effects on bone crystals**. *J. Bone Miner. Res.*, v. 5, p. 169–175, 1990.
- [44] ZBINDEN, M., MARTINEZ, I., GUYOT, F., CAMBON-BONAVITA, M.-A. & GAILL, F. **Zinc-iron sulphide mineralization in tubes of hydrothermal vent worms**. *Eur. J. Mineral.*, v. 13, p. 653–658, 2001.
- [45] SZCZEPANIK, P. & SAWLOWICZ, Z. **Potential ZnS fossilization of gastropods (Middle Jurassic claystones from Central Poland)**. *Naturwissenschaften*, v. 95, p. 869–76, 2008.
- [46] HALLIDAY, I., BLACKWELL, A. T. & GRIFFIN, A. A. **Fossils of hydrothermal vent worms from cretaceous sulfide ores of the Samail Ophiolite, Oman**. *Science*, v. 223, p. 1407–1409, 1984.
- [47] GRASSLE, J. F. **Hydrothermal vent animals: distribution and biology**. *Science*, v. 229, p. 713–717, 1985.
- [48] JANNASCH, H. W. & MOTTTL, M. J. **Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents**. *Science*, v. 229, p. 717–725, 1985.
- [49] CORLISS, J. B. et al. **Submarine thermal springs on the Galápagos rift**. *Science*, v. 203, p. 1073–1083, 1979.
- [50] SPIESS, F. N. et al. **East pacific rise: hot springs and geophysical experiments**. *Science*, v. 207, p. 1421–1433, 1980.
- [51] EDMOND, J. M., VON DAMM, K. L., MCDUFF, R. E. & MEASURES, C. I. **Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal**. *Nature*, v. 297, p. 187–191, 1982.
- [52] NUNEZ-NOGUEIRA, G., RAINBOW, P. S. & SMITH, B. D. **Assimilation efficiency of zinc and cadmium in the decapod crustacean *Penaeus indicus***. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, v. 332, p. 75–83, 2006.
- [53] AHSANULLAH, M., NEGILSKI, D. S. & MOBLEY, M. C. **Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. I. Effects of individual metals**. *Mar. Biol.*, v. 64, p. 299–304, 1981.
- [54] ROMEO, M., GHARBI-BOURAOU, S., GNASSIA-BARELLI, M., DELLALI, M. & AISSA, P. **Responses of *Hexaplex (Murex) trunculus* to selected pollutants**. *Sci. Total Environ.*, v. 359, p. 135–44, 2006.

- [55] KULIKOVA, N. N. et al. **Biogeochemical characteristics of dominant gastropod species from the stony littoral of southern Baikal**. *Geochemistry Int.*, v. 45, p. 478–489, 2007.
- [56] GUNDACKER, C. **Comparison of heavy metal bioaccumulation in freshwater molluscs of urban river habitats in Vienna**. *Environ. Pollut.*, v. 110, p. 61–71, 2000.
- [57] WHITE, S. L. & RAINBOW, P. S. **Regulation and accumulation of copper, zinc and cadmium by the shrimp *Palaemon elegans***. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 8, p. 95–101, 1982.
- [58] LABRENZ, M. et al. **Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria**. *Science*, v. 290, p. 1744–1747, 2000.