

CARACTERIZACIÓN TÉRMICA DE UN CONTENEDOR CRIOGÉNICO AJUSTABLE PARA PRESERVACIÓN DE PAJILLAS CON SEMEN BOVINO

Francisco Javier Godínez-García¹, Martín Alejandro Espinoza-Uc¹, Josué Ortiz-Medina¹, Eduardo Gamero-Inda¹, José Antonio Martínez-Rivera¹, Rubén Guerrero-Rivera¹

¹Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Durango, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Maestría en Ingeniería. Blvr. Felipe Pescador 1830 Ote. C.P. 34080 Durango Dgo., México. Tel. 6188290900. fgodinez@itdurango.edu.mx, 09040970@hitdurango.edu.mx

Resumen

Este trabajo consiste en la caracterización térmica de un contenedor ajustable en dimensiones de volumen, diseñado para la preservación de pajillas con semen de ganado bovino. Para la identificación de las variables térmicas durante el proceso de criogenización, fueron calculados y medidos los coeficientes globales de transferencia de calor en la cámara criogénica utilizando el concepto de transferencia de calor por resistencias térmicas, de tal manera, que es posible verificar la eficacia del poliuretano empleado, así como la dispersión del Nitrógeno fase gas en relación con los cambios en el flujo másico de nitrógeno líquido (LN2) necesario para obtener un cambio gradual de temperatura desde +5°C a -140°C para garantizar una congelación adecuada del espécimen durante 7 minutos.

Palabras clave— Criocongelador, Caracterización térmica, flujo másico de nitrógeno

Abstract

This work consists of the thermal characterization of an adjustable container in volume dimensions, designed for the preservation of straws with bovine semen. For the identification of the thermal variables during the cryogenic process, the global heat transfer coefficients of the cryogenic chamber were calculated and measured, through the concept of heat transfer by thermal resistances, managing to verify the effectiveness of the polyurethane used, as well as, the dispersion of the gas phase nitrogen in relation to the changes in the mass flow of liquid nitrogen (LN2) necessary to obtain a gradual change of temperature from +5°C to -140°C to guarantee adequate freezing of the specimen for 7 minutes.

Keywords— Cryofreezer, Thermal characterization, nitrogen mass flow

1. INTRODUCCIÓN

En el campo de la ganadería, la inseminación artificial consiste en la extracción de muestras seminales de los sementales mediante una monta artificial, estas muestras son introducidas dentro de pajillas y posteriormente almacenadas a (-140 a -180 °C) hasta el momento de su implantación. Durante el procedimiento de criopreservación, se requiere un enfriamiento controlado del semen bovino, sujeto a un

protocolo de congelación establecido para cada especie [2]. Los criocongeladores programables utilizados para el almacenamiento de pajillas con contenido de semen bovino, siguen un protocolo de congelación estricto, desde la temperatura ambiente hasta 123K (-150°C) y utilizan nitrógeno líquido (LN2) como agente frigorígeno [15] [16] [17]. Este fluido es conducido a la cámara criogénica, cambiando a fase gaseosa al momento de entrar en contacto con el aire del interior para ser homogenizado mediante una turbina de expansión. Existen criocongeladores fijos de diferentes capacidades de almacenamiento y consumo de nitrógeno por ciclo de congelación [4]. La eficiencia de estos puede disminuir cuando se tiene poca producción de pajillas durante la ordeña y un gran volumen de almacenamiento, debido al alto consumo de nitrógeno por ciclo, por lo que el costo de operación puede aumentar considerablemente, así como la capacidad de almacenamiento puede ser insuficiente cuando hay una gran producción de pajillas [18]. El desarrollo de un criocongelador ajustable en volumen de almacenamiento favorece el consumo de nitrógeno reduciendo costos de operación. Debido a que en el mercado no existen criocongeladores con una cámara criogénica ajustable, fue diseñado un prototipo de forma cilíndrica vertical, dentro del cual se desplaza un émbolo guiado por una flecha de tornillo sinfín, con la finalidad de modificar el volumen de la cámara criogénica en 3 diferentes capacidades de almacenamiento. Mediante el concepto de red de resistencias térmicas en estado estacionario [3], fue calculada la razón de transferencia de calor hacia la cámara criogénica para los tres volúmenes con temperaturas acordes al tipo de materiales de cada componente, su aislamiento térmico y los coeficientes de transferencia de calor por convección “h” dentro y fuera de la cámara criogénica, obtenidas mediante la “Ley de enfriamiento de Newton”, en conjunto con la relación empírica del “Número de Nusselt” [7] correspondiente con la geometría de la cámara criogénica y los parámetros adimensionales involucrados, tal como el “Número de Rayleigh”, “Número de Prandtl” y “Número de Grashof”, fueron calculados para cada volumen de almacenamiento y temperatura. Esto permitió evaluar la eficiencia térmica del aislamiento, así como realizar los cálculos para la obtención de la masa mínima de nitrógeno gaseoso para determinada temperatura y volumen de almacenamiento conforme la ley de los gases ideales [4].

2. CARACTERIZACIÓN TÉRMICA

2.1 Caracterización térmica de cámara criogénica

Basados en que el calor siempre fluye del objeto caliente al frío mediante tres posibles fenómenos de transporte; conducción, convección y radiación hacia el sistema criogénico, el principal problema es reducir el flujo de calor hacia este, ya que el calor fluye desde el ambiente hacia la cámara criogénica del equipo por convección natural con el aire atmosférico que lo rodea [10][11], lo que ocasiona que el control en el descenso en la temperatura se vuelva complejo debido al gradiente de temperatura entre la cámara y el ambiente, por lo que el calor que fluye a la cámara afecta

directamente al controlador de temperatura y consumo de Nitrógeno (LN₂).

El Sistema criogénico, comprende una carcasa exterior y la cámara criogénica, ambos de forma cilíndrica, fabricados de acero inoxidable AISI 304 dadas sus propiedades para baja contracción térmica y baja conductividad térmica 14.9W/mK a diferencia de otros metales, además de ser resiliente a temperaturas criogénicas. El aislamiento térmico empleado, es de poliuretano con conductividad térmica de 0.023W/mK y se adapta fácilmente al contorno cilíndrico de la cámara criogénica. En la figura 1, se observa una imagen del sistema criogénico cilíndrico vertical, con 1m de altura y 41.7 cm de diámetro. El Criocongelador contiene una válvula para alivio de presión, entrada de nitrógeno y turbina de expansión para homogenizar el nitrógeno dentro de la cámara criogénica.

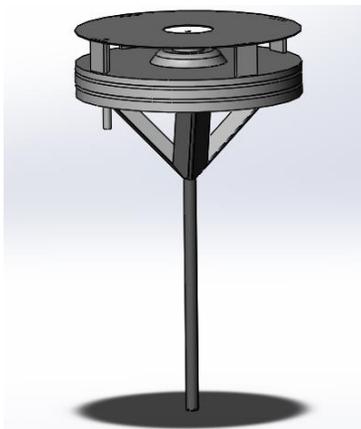
Figura 1. Representación gráfica de criocongelador elaborado mediante el software SOLIDWORKS®



Fuente: Elaboración propia

La figura 2, muestra el émbolo de desplazamiento vertical posicionado dentro de la cámara criogénica, fabricado con materiales de acero inoxidable.

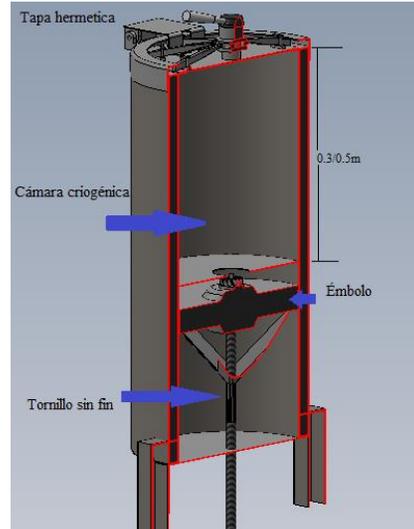
Figura 2. Representación gráfica de émbolo elaborado mediante el software SOLIDWORKS®



Fuente: Elaboración propia

El sistema criogénico evaluado, posee tapa hermética, cámara criogénica y un émbolo accionado por tornillo sin fin para el desplazamiento ajustable de la cámara criogénica, mostrado en la Figura 3.

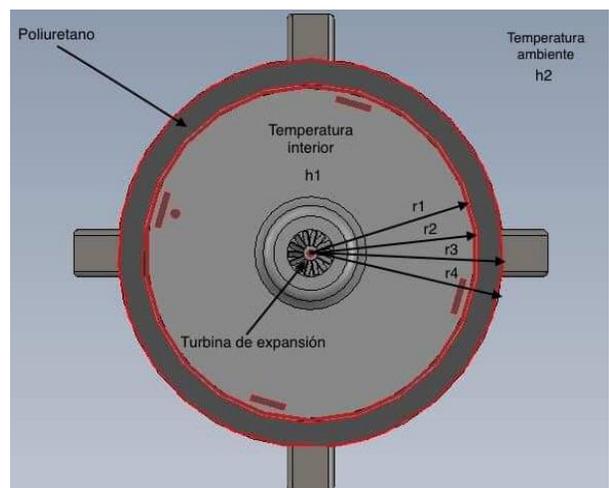
Figura 3. Corte longitudinal del equipo criogénico elaborado mediante el software SOLIDWORKS®



Fuente: Elaboración propia

La figura 4, muestra un corte transversal, en el que se aprecian las temperaturas interiores $h1$ y exteriores $h2$, además de los coeficientes de transferencia de calor por convección internos y externos, así como la turbina de expansión utilizada para homogenizar la masa de nitrógeno en fase gaseosa dentro de la cámara criogénica. Entre el radio 1 y el radio 2 se encuentra el cilindro1, este tiene un grosor de 0.26 cm y es de acero inoxidable AISI 304. El aislamiento térmico tiene un grosor de 2.74 cm, en tanto que la carcasa externa es de 0.1 cm del mismo material que del cilindro1.

Figura 4. Corte transversal de cámara criogénica elaborado mediante el software SOLIDWORKS®



Fuente: Elaboración propia

Los parámetros y variables consideradas para la caracterización del criocongelador son descritos en la tabla 1, y están referenciadas al volumen de almacenamiento y la altura (L) a la que se encuentra posicionado el émbolo.

Tabla 1. Características de la cámara criogénica

Radio 1 (r1)	0.1775m		
Radio 2 (r2)	0.1801m		
Radio 3 (r3)	0.2075m		
Radio 4 (r4)	0.2085m		
Altura (L)	0.30m	0.40m	0.50m
Volumen	29.69Lts	35.59Lts	49.48Lts
Criógeno	LN ₂		
Presión Max	1 atm		
Temperatura de operación	26/- 150°C		

2.2 Formulación matemática

El *Coefficiente global de transferencia de calor* "Q", fue calculado considerando la relación total de temperaturas y la suma de las resistencias térmicas [3].

$$\dot{Q} = \frac{(T_{\infty o} - T_{\infty i})}{R_{Total}} \quad (1)$$

Donde: T (temperaturas de operación e interna), R_{Total} (resistencia total)

$$R_{Total} = R_1 + R_2 + R_3 + R_4 + R_n \dots \quad (2)$$

Para el cálculo de las resistencias térmicas fue aplicada la Ley de Fourier [3], considerando una relación de transferencia de calor para un cilindro mediante:

$$q_r = -kA \frac{dT}{dr} = -2\pi krL \frac{dT}{dr} \quad (3)$$

Donde: K (conductividad térmica), T (temperatura)

$$A = 2\pi rL \quad (4)$$

Donde: r (radio), L (longitud), A (área)

De esta manera, el valor de q, se determina con la ecuación:

$$q = \frac{2\pi krL(T_i - T_e)}{\ln(r_e/r_i)} \quad (5)$$

Donde: T_i (temperatura interior), T_e (temperatura exterior)

Considerando que la resistencia térmica en un cilindro de material x es dada por:

$$R_{tér} = \frac{\ln(r_e/r_i)}{2\pi Lk} \quad (6)$$

Donde: r_e (resistencia del exterior), r_i (res)

Y la resistencia de calor por convección en una pared cilíndrica es:

$$R_{conv} = \frac{1}{2\pi rLh} \quad (7)$$

De esta manera es posible encontrar el *Coefficiente de transferencia de calor por convección "h"*, determinado mediante un enfoque teórico que implica resolver las ecuaciones de la capa límite para una geometría en particular [1]. El cálculo del coeficiente convectivo se determina a partir de número de Nusselt, y es dependiente del número de Grashof (Gr), número de Prandtl (Pr), número de Rayleigh (Ra) y una constante (C):

$$Nu = \frac{hL}{k} = C(GrPr)^n = CRa_L^n \quad (8)$$

Para encontrar la *Correlación empírica para conducción de calor por convección natural a través de una placa vertical* y determinar el número de Nusselt involucrado en el cálculo del coeficiente convectivo h de la cámara criogénica, se utilizó la correlación empírica de una placa vertical isoterma [7].

$$Nu = \left\{ 0.825 + \frac{0.387Ra^{1/6}}{\left[1 + (0.492/Pr)^{9/16}\right]^{8/27}} \right\}^2 \quad (9)$$

la cual, se puede utilizar en cilindros verticales si se cumple la condición:

$$D \geq \frac{35L}{Gr_L^{1/4}} \quad (10)$$

Número de Rayleigh "Ra"

$$Ra = \frac{g \cdot \beta(T_s - T_{\infty})L^3}{\nu\alpha} \quad (11)$$

Número de Grashof "Gr"

$$Gr = \frac{g \cdot \beta(T_s - T_{\infty})L^3}{\nu^2} \quad (12)$$

Número de Prandtl "Pr"

$$Pr = \frac{\mu C_p}{K} \quad (13)$$

En el cálculo del coeficiente convectivo relacionado con el cálculo de la última resistencia, en contacto con el ambiente, se usó la ecuación simplificada de un cilindro vertical en convección natural con el aire a presión atmosférica [6].

$$h = 1.42 \left(\frac{\Delta T}{L} \right)^{1/4} \quad (14)$$

2.3 Metodología de solución

Para el cálculo del coeficiente global de transferencia de calor Q de la cámara criogénica, a una temperatura de -150°C (123K) en la capacidad de almacenamiento mínima de esta (29.69 L) con 0.30m de altura y 26°C (299K) en el ambiente,

fue calculado el coeficiente de transferencia de calor global \dot{Q} , para $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la cámara y $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el ambiente, necesario para establecer la diferencia total de temperaturas.

Y dividirlo entre la suma de las resistencias consideradas en el sistema de la cámara criogénica:

$$R_{\text{Total}} = R_{\text{Convección-interna}} + R_{\text{Cilindro1}} + R_{\text{aislante}} + R_{\text{Cilindro2}} + R_{\text{Convección-externa}} \quad (15)$$

Para calcular, $R_{\text{Convección-interna}}$ se determina el coeficiente convectivo h en el interior de la cámara criogénica a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ considerando las características de la misma. De esta manera, el coeficiente convectivo es determinado conjuntamente por una correlación empírica del número de Nusselt para cilindros verticales, el número de Rayleigh Ra , el número de Prandtl Pr y el número de Grashof Gr , las propiedades termodinámicas evaluadas son del aire atmosférico a la temperatura media de la capa límite $T_f = T_{\infty 1} + T_{\infty 2}/2$ denominada temperatura de película. Para este caso fue considerada de $-62\text{ }^{\circ}\text{C}$ (211K). Los valores para Ra , Pr y Gr respectivamente fueron calculados mediante las expresiones:

$$Ra = \frac{g \cdot \beta (T_s - T_{\infty}) L^3}{\nu \alpha} \quad (16)$$

Sustituyendo valores:

$$Ra = Ra = -2356871511.67999$$

El número de Prandtl:

$$Pr = \frac{\mu C_p}{K} \quad (17)$$

μ (Viscosidad dinámica), C_p (calor específico), K (conductividad térmica)

El número de Grashof:

$$Gr = \frac{g \beta (T_s - T_{\infty}) L^3}{\nu^2} \quad (18)$$

$$Gr = -26823.76$$

Para utilizar la correlación empírica de la placa vertical en el cilindro vertical, el diámetro D debe cumplir la condición.

$$D \geq \frac{35L}{Gr_L^{1/4}} \quad (19)$$

De esta manera: Se cumple la condición: $0.355\text{m} \geq -0.8204\text{m}$

De esta manera al sustituir los valores en la correlación empírica para determinar el número de Nusselt:

El coeficiente de transferencia de calor por convección a partir del número de Nusselt

$$h = \frac{NuK}{L} \quad (20)$$

Una vez obtenido el coeficiente de convección interno, es posible calcular el valor de la primera resistencia R_{conv1} :

$$R_{\text{convección1}} = \frac{1}{2\pi r L h_i} \quad (21)$$

La Resistencia dos corresponde a la pared cilíndrica de la cámara criogénica de acero AISI 304 con conductividad térmica de 14.9W/mK con radio interno de 0.1775m y externo de 0.1801m , R_{cil1} se calcula con la expresión:

$$R_{\text{cilindro1}} = \frac{\ln(r_2/r_1)}{2\pi k L} \quad (22)$$

$$R_{\text{cil1}} = 0.000517\text{ }^{\circ}\text{C/W}$$

La tercera resistencia corresponde al aislante térmico de poliuretano expandido con conductividad térmica de 0.023W/mK con grosor de 2.74cm

$$R_{\text{poliuretano}} = \frac{\ln(r_3/r_2)}{2\pi k L} \quad (23)$$

La cuarta Resistencia es fabricada de acero inoxidable AISI 304 y su espesor es de 1mm

$$R_{\text{cilindro2}} = \frac{\ln(r_4/r_3)}{2\pi k L} \quad (24)$$

Por último, la quinta resistencia, corresponde al coeficiente convectivo h para un cilindro vertical en contacto con el aire atmosférico a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$, y la temperatura superficial del criocongelador es de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, obtenido de la fórmula:

$$h_o = 1.42 \left(\frac{\Delta T}{L} \right)^{1/4} \quad (25)$$

Se calcula la última resistencia:

$$R_{\text{convección2}} = \frac{1}{2\pi r_4 L h_o} \quad (26)$$

Tabla 2. Valores resultantes para las Resistencias

Resistencia	Resultado
$R_{\text{convección1}}$	$0.387169\text{ }^{\circ}\text{C/W}$
$R_{\text{cilindro1}}$	$0.000517\text{ }^{\circ}\text{C/W}$
$R_{\text{poliuretano}}$	$3.266576\text{ }^{\circ}\text{C/W}$
$R_{\text{cilindro2}}$	$0.000171\text{ }^{\circ}\text{C/W}$
$R_{\text{convección2}}$	$0.587278\text{ }^{\circ}\text{C/W}$
R_{Total}	$4.241712\text{ }^{\circ}\text{C/W}$

A partir de la diferencia de temperaturas (ΔT) en relación con R_{Total} , es posible calcular el coeficiente global de transferencia de calor \dot{Q} mediante:

$$\dot{Q} = \frac{(T_{\infty o} - T_{\infty i})}{R_{Total}} \quad (27)$$

Siendo la razón de calor (ganancia de calor) que está entrando a la cámara criogénica desde el ambiente a 299K (26°C) cuando se alcanza la temperatura más baja de operación 123K (-150°C) para un volumen de almacenamiento bajo.

Aislamiento térmico

Se considera que un aislamiento térmico es eficiente cuando existe un gradiente de temperatura mayor o igual al 85% entre la cámara criogénica y el ambiente, en este caso se tomó la temperatura mínima de operación (-150°C) y el ambiente (26°C). El aumento en la temperatura a través de la primera pared cilíndrica y del poliuretano expandido se determinan con la ecuación del gradiente de temperatura:

$$\Delta T_{cilindro1} = \dot{Q} R_{cilindro1} \quad (28)$$

$$\Delta T_{poliuretano} = \dot{Q} R_{poliuretano} \quad (29)$$

Con este valor, se asume que las temperaturas entre la superficie interior y exterior del cilindro1 difieren en 0.02145 °C, en tanto que, las temperaturas interior y exterior del aislamiento térmico difieren en 135.53873°C.

Por lo que la resistencia del cilindro1 es demasiado pequeña en comparación con la resistencia del poliuretano expandido, lo cual es de esperarse ya que cualquier metal es buen conductor del calor. El aislamiento térmico de un equipo criogénico siempre provee la mayor resistencia térmica. El gradiente de temperatura entre en ambiente y la cámara criogénica es de 176°C. Para determinar la diferencia de temperaturas entre la cámara criogénica y el ambiente, se suman las resistencias de los dos cilindros, el poliuretano y el ambiente y se multiplica por \dot{Q} :

$$\Delta T_{Tinterna-Texterna} \quad (30)$$

Existe una diferencia de temperatura de 159.9354°C entre la cámara criogénica a -150°C y el ambiente a 26°C. El gradiente entre la cámara criogénica y el ambiente es de 176°C. Con base a este cálculo se determina que la eficacia del aislamiento térmico es del 90%.

La masa de nitrógeno gasificado existente en la cámara criogénica, en el volumen de almacenamiento de 29.69 Litros a temperaturas -150°C (123K) y presión atmosférica, es determinada por la ecuación de los gases ideales [5]:

$$PV = \frac{mRT}{M} \quad (31)$$

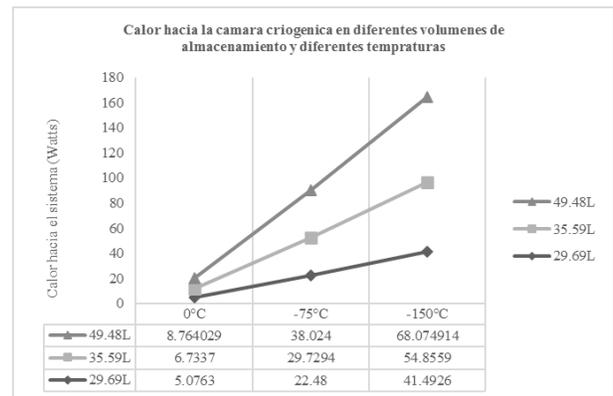
Para una temperatura de 123 K (-150°C) en el volumen de almacenamiento de 29.69L, existen por lo menos 82.423

gramos de nitrógeno en fase gaseosa dentro de la cámara criogénica.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando es aplicado nitrógeno líquido para la congelación de pajillas con semen bovino dentro de la cámara ajustable del congelador criogénico, es necesario considerar que este tiene una temperatura de ebullición de -195 °C a presión atmosférica y presenta un calor latente de vaporización o entalpía de vaporización extremadamente bajo (48cal/gr) en comparación con el agua (540cal/gr) [13], esto significa que se requiere muy poca energía para evaporarlo y aumentar su temperatura, debido a este efecto es de vital importancia disminuir en lo posible los flujos de calor convectivos hacia la cámara criogénica para poder tener un buen control en la temperatura interna y un buen rendimiento de nitrógeno por ciclo de operación en la criogenización de las pajillas con semen bovino [14]. Los valores resultantes para determinar la ganancia de calor en la cámara criogénica para los tres volúmenes de almacenamiento (29.69L, 35.59L y 49.48L) a temperaturas de operación 273K (0°C), 198K (-75°C) y 123K (-150°C), son mostrados en la figura 5.

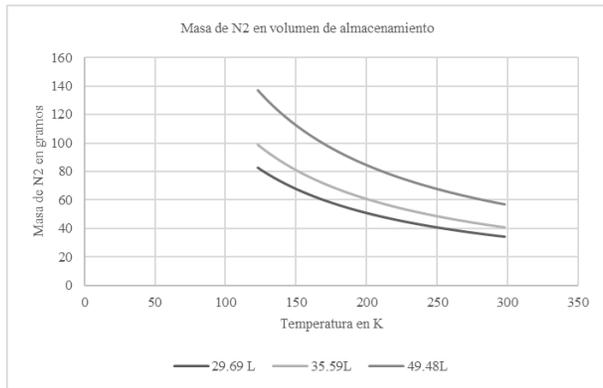
Figura 5. Ganancia de calor en volúmenes de almacenamiento



Fuente: Elaboración propia

Se puede observar que siempre existe un flujo de calor hacia la cámara criogénica debido a la ausencia de un aislamiento térmico ideal que lo pueda evitar. Por esta razón, se determinó que existe un mayor flujo de calor cuando se alcanza una menor temperatura en volúmenes de almacenamiento mayores. La evaluación para determinar la masa mínima de nitrógeno existente en tres volúmenes de almacenamiento en un rango de temperaturas desde 299K (26°C) hasta 123K (-150°C), es mostrado en la figura 6, se puede apreciar que la cantidad de nitrógeno dentro de la cámara criogénica presenta una variación a causa de la despresurización del equipo, los flujos de calor hacia el sistema, la temperatura de los materiales, entre otros. Por otra parte, para obtener una temperatura menor en un volumen de almacenamiento mayor se requiere mayor cantidad de nitrógeno dentro de la cámara.

Figura 6. Masa de nitrógeno mínima requerida para diferentes temperaturas y volúmenes de almacenamiento



Fuente: Elaboración propia

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La implementación de un sistema criogénico eficiente de volumen ajustable permite reducir costos de operación del consumo de nitrógeno por ciclo de trabajo.

El protocolo de criogenización de las pajillas de semen bovino que se da en la cámara criogénica puede ser controlado con mayor facilidad debido a que el aislamiento térmico del criocongelador es eficaz, no obstante, siempre existirá un flujo de calor hacia la cámara debido a que no existe aislamiento térmico perfecto ya que existe un aumento en la ganancia de calor conforme cambia la temperatura a medida que el volumen cambia, a pesar del aislamiento térmico. Un descenso en la temperatura implica tener una mayor cantidad de masa de nitrógeno existente dentro de la cámara, esto se debe en gran parte al flujo de calor por convección que fluye hacia la misma y al cambio en el aumento de volumen de almacenamiento, por esta razón, fue calculada la masa de nitrógeno mínima en fase gaseosa con valor de 33 gramos para un volumen variable en el sistema criogénico, por lo que es recomendable monitorear en todo momento y tomar las precauciones debidas durante la evolución de la dinámica de congelación, ya que la presión en el interior tiende a elevarse drásticamente.

5. REFERENCIAS

- [1] Biddle, J. (5 de Febrero de 2021). Heat Transfer (07): Overall heat transfer coefficient, composite geometries examples. Mechanical Engineering.
- [2] Çengel, Y. & Gahar, A. J. (2011). *Transferencia de calor y masa*. México: The McGraw-Hill.
- [3] Çengel, Y. & Gahar, A. J. (2011). Cilindros y esferas con capas múltiples. En *Transferencia de calor y masa*. (págs. 156-160). México: Mc Graw Hill.
- [4] Dalal, J., Dutt, R., Kumar, A., & Singh, G. (2018). Different Cooling Rates for Cryopreservation of Semen in Various Livestock Species: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 10.
- [5] Emanuel Asesorías. (31 de Agosto de 2017). *Ecuación de los GASES IDEALES (fórmulas despejadas)*. <https://www.youtube.com/watch?v=OIWcl1UMBjg>
- [6] Flores, R. (24 de Mayo de 2021). *Problema de transferencia de calor en un cilindro aislado*. <https://www.youtube.com/watch?v=vw89y3-bJWo&t=1558s>
- [7] Frank P. Incropera, D. P. (1999). *Fundamentos de Transferencia de Calor*. México: Prentice Hall Hispanoamericana, S.A.
- [8] Holman, J. (1998). *Transferencia de calor*. Madrid: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S. A.
- [9] Incropera, F. P., & P. De Witt, D. (1999). *Fundamentos de Transferencia de Calor*. México: Prentice Hall.
- [10] Mejía Delgado, A. (23 de Febrero de 2019). *Lección 6. Convección*. https://www.youtube.com/watch?v=Cz1j_PWbK4&list=LL&index=50
- [11] Mejía, A. D. (23 de Febrero de 2019). Obtenido de youtube: https://www.youtube.com/watch?v=Cz1j_PWbK4&list=LL&index=56
- [12] Pérez, R. G. (22 de Agosto del 2013). *Criogenia Cálculo de equipos recipientes a presión*. Ediciones Díaz de Santos.
- [13] Reynaga, D. (18 de Noviembre de 2019). *Calor latente de vaporización-cálculo*. Obtenido de youtube: https://www.youtube.com/watch?v=QS1_v46vijs
- [14] Vishwannath, R., & Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *elsevier*, 31.
- [15] Wolkers, F. O. (2015). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. New York Plaza: Humana Press.
- [16] Zohuri, B. (2018). an ultralow temperature phenomenon. *Physics of cryogenics*. Amsterdam: Elsevier.
- [17] A.R Peres, L.M. Barbosa, M.Y. Kanazawa, M.I. Martins, F.F. De Souza, Cryopreservation of bovine spermatozoa from the epididymal tail using conventional and automated methods, *Arch med vet*, 2014, vol.46 no.1, p.31-38.
- [18] Thurston L. M., Holt W. V, Watson P. F. 2003. Postthaw Functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controller rate freezers: a comparison. *Theriogenology*. 60: 101-13.