



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

---

# Índice

1. Índice .....	2
2. Resumen y abstract.....	3
3. Introducción .....	4
3.1. Sistemas de producción .....	5
3.2. La avicultura de puesta en europa y en españa.....	6
3.3. Criterios de calidad del huevo.....	9
3.4. El estrés en avicultura .....	10
3.5. Feromonas maternas de gallina .....	13
4. Justificación y objetivos.....	15
5. Metodología .....	16
6. Resultados y discusión .....	21
6.1. Granja comercial .....	21
6.2. Granja experimental.....	25
6.2.1. Calidad de huevo.....	25
6.2.2. Ritmos circadianos .....	29
7. Conclusiones/conclusions .....	32
8. Valoración personal.....	33
9. Bibliografía .....	34

## 2. RESUMEN Y ABSTRACT

### RESUMEN

Las feromonas son sustancias químicas naturales producidas por un organismo que desempeñan un papel importante en la comunicación entre individuos de una misma especie. Un tipo de feromonas son las apaciguadoras maternas, que son capaces de reducir el estrés de los animales y que podrían mejorar la eficiencia productiva y el bienestar de los mismos.

En la presente investigación se han realizado dos pruebas: una en granja comercial (con un total de 840 huevos analizados) y otra bajo condiciones experimentales (con un total de 960 huevos analizados), valorando en ambos casos el efecto que el uso de feromonas maternas tiene en la calidad del huevo de gallina.

Se ha observado que el uso de feromonas apaciguadoras maternas sintéticas en gallinas puede repercutir positivamente en las unidades Haugh del albumen (aportando 0,73 unidades más), aunque puede afectar negativamente a las características externas de la cáscara, tales como grosor (11,35  $\mu\text{m}$  menos), dureza (1,47 N menos) y densidad (2,68  $\text{mg}/\text{cm}^2$  menos). Son convenientes estudios cruzados que complementen el presente experimento y aporten datos más determinantes.

### ABSTRACT

Pheromones are natural chemical substances produced by an organism that play an important role in communication between individuals of the same species. One type of pheromones is maternal appeasing pheromones, which can reduce animal stress and could improve their productive efficiency and welfare.

In the present research, two tests were conducted: one in a commercial farm (with a total of 840 eggs analyzed) and another under experimental conditions (with a total of 960 eggs analyzed), evaluating in both cases the effect of using maternal pheromones on the quality of chicken eggs.

It has been observed that the use of synthetic maternal appeasing pheromones in hens can positively impact the Haugh units of the albumen (providing an increase of 0.73 units), although it may negatively affect the external characteristics of the shell, such as thickness (11.35  $\mu\text{m}$  less), hardness (1.47 N less), and density (2.68  $\text{mg}/\text{cm}^2$  less). Cross-studies are advisable to complement the present experiment and provide more conclusive data.

### 3. INTRODUCCIÓN

La avicultura de puesta es una parte fundamental de la industria agrícola a nivel mundial que proporciona una fuente muy valiosa de nutrientes para la alimentación humana. Hay estudios que posicionan al huevo como un alimento fundamental para garantizar una alimentación equilibrada, especialmente en países en vías de desarrollo y en mujeres embarazadas y niños (Lutter y Morris, 2018). Esto es debido a su alta composición en aminoácidos y ácidos grasos esenciales (linoleico y  $\alpha$ -linolénico), vitaminas y minerales (Iannotti et al., 2014). Estas características hacen del huevo un alimento básico con una gran repercusión desde el punto de vista económico y social por la fijación de población en áreas rurales. Asimismo, mejorar el bienestar de las aves de puesta supone un desafío constante, y este se relaciona con la productividad de los animales y la calidad de los huevos producidos. Es por estas razones que resulta de especial interés trabajar en la optimización del sector avícola de puesta.

Las feromonas son sustancias químicas naturales producidas por un organismo que desempeñan un papel importante en la comunicación entre individuos de una misma especie. Estas son liberadas por un organismo para modular el comportamiento o la fisiología de sus congéneres (Riddell et al., 2021). Un tipo de feromonas son las apaciguadoras maternas, que son capaces de reducir el estrés de los animales y que podrían mejorar la eficiencia productiva y el bienestar de los mismos (Pageat, 2001). Dichas feromonas se han estudiado en diferentes especies como cánidos y félidos (Pageat y Gaultier, 2003), suidos (McGlone y Anderson, 2002), pollos (Madec et al., 2008a), equinos (Van Sommeren y Van Dierendonck, 2010) o ratas (Moltz y Lee, 1981), entre otras. Sin embargo, no son tantos los estudios existentes en gallinas de puesta. Peixoto et al. (2021), por ejemplo, afirman que la cría y el alojamiento de madres en sistemas avícolas mostraron efectos positivos en el comportamiento y la respuesta al estrés de la descendencia, aunque no especificaron si estos hechos se debían a las feromonas apaciguadoras maternas o a otros efectos.

El picaje, la histeria y los amontonamientos son signos característicos de estrés en gallinas, los cuales tienen repercusiones negativas sobre los índices productivos (Mumma et al., 2006). En los pollos de engorde los signos de estrés se pueden modular con el uso de feromonas apaciguadoras maternas, según demuestran Madec et al. (2008a), por lo que es de interés corroborar si este hecho también ocurre en las gallinas de puesta y si tiene alguna repercusión en la calidad del huevo.

### 3.1. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

La producción de huevos en Europa se clasifica en cuatro sistemas: en jaulas, en suelo, campero (con acceso al exterior) y ecológico (con acceso al exterior). Los tres últimos sistemas conforman la cría en sistemas alternativos. El Real Decreto 3/2002, del 11 de enero, por el que se establecen las normas mínimas de protección de las gallinas ponedoras, establece los requisitos de dichos sistemas en España:

- Jaulas acondicionadas: deben disponer de al menos 750 centímetros cuadrados de superficie de jaula (600 centímetros cuadrados de superficie utilizable) por gallina, al menos 12 centímetros de comedero por gallina y al menos dos boquillas de agua por gallina (en caso de bebederos con conexiones). La jaula ha de tener una superficie mínima de 2.000 centímetros cuadrados y una altura mínima en cualquier punto de la superficie utilizable de 20 centímetros (con una altura mínima de la jaula de 45 cm), además de disponer de un nido, una yacija que permita picotear y escarbar, unos aseladeros que ofrezcan mínimo 15 centímetros por gallina y dispositivos de recorte de uñas. Estas jaulas son obligatorias desde el 1 de enero de 2012.
- Sistemas alternativos: los comederos longitudinales han de ofrecer al menos 10 centímetros por ave y, los circulares, 4. En el caso de los bebederos de boquilla, debe haber al menos uno por cada 10 gallinas y cada gallina tendrá acceso como mínimo a dos boquillas. Debe haber al menos un nido por cada 7 gallinas y al menos 15 centímetros de aseladero por gallina. La densidad de aves es de máximo nueve gallinas por metro cuadrado de superficie utilizable. En los casos en los que las gallinas puedan desplazarse por varios niveles, el número máximo de niveles es 4, la altura libre entre ellos ha de ser de 45 centímetros y han de estar dispuestos de tal manera que se impida la caída de excrementos sobre los niveles inferiores. En los casos en los que las gallinas tienen acceso a espacios exteriores la nave debe disponer de varias trampillas con una anchura total de 2 metros por grupo de 1.000 gallinas y el exterior ha de estar provisto de refugios contra intemperies y depredadores.

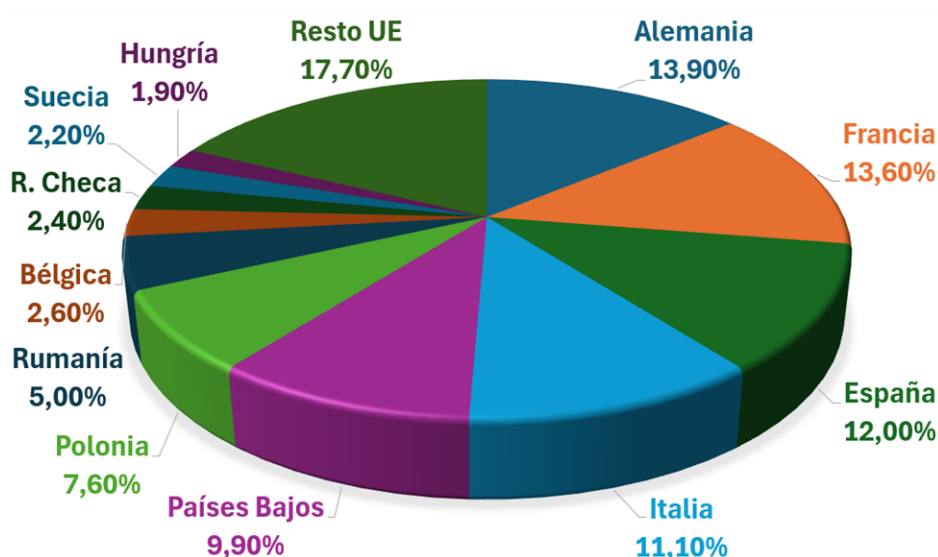
En todos los sistemas mencionados es crucial el control de las horas de luz, así como su intensidad, y de la temperatura. Las horas de oscuridad han de ser aproximadamente 8, respetándose un periodo de penumbra cuando disminuya la luz (RD 3/2002). En relación con la intensidad de luz, una exposición de 5-30 luxes con luz natural o LED blanco cálido proporcionan un equilibrio entre el bienestar y el rendimiento en las pollitas (Du et al., 2022). La temperatura

ideal se encuentra entre los 20 y los 23°C. Estos controles permiten disminuir las probabilidades de picaje y garantizar un correcto descanso y estado inmunitario de las gallinas.

### 3.2. LA AVICULTURA DE PUESTA EN EUROPA Y EN ESPAÑA

El sector de la avicultura de puesta es crucial para la economía tanto en España como en Europa, contribuyendo significativamente al Producto Interior Bruto (PIB) agrícola. España es uno de los mayores productores de huevos de Europa, con un consumo per cápita elevado, significativas exportaciones, y generación de empleo directo e indirecto. Según el informe del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2023) sobre la avicultura de puesta, a nivel de la UE, España produce el 12% del total de la producción europea de huevos de gallina, ocupando el tercer lugar en producción de huevos, seguido de Italia y por detrás de Francia (que abarca el 13,6% de la producción) y Alemania (con el 13,9%), como se aprecia en la figura 1.

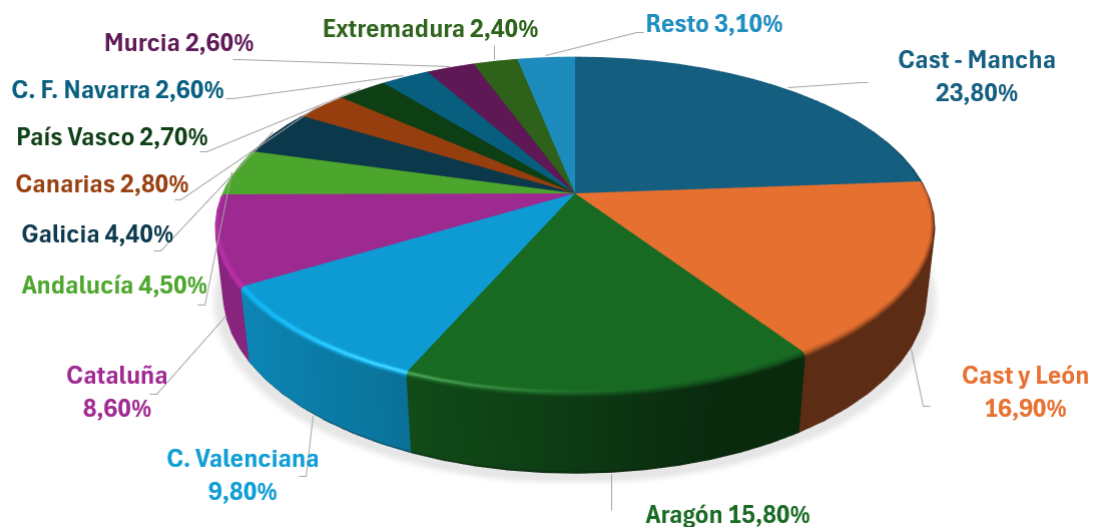
Figura 1. Producción total de huevos de gallina en la UE en 2022 según países (elaboración propia) (MAPA, 2023).



El número de explotaciones de aves en España se ha ido incrementando de manera significativa en los últimos años. En el caso concreto de la avicultura de puesta, en enero de 2023 estaban registradas 2.053 explotaciones, lo que supone un incremento cercano al 10% respecto a enero de 2022. Este ascenso se debe al incremento de las explotaciones de producción, ya que el resto de las clasificaciones zootécnicas (selección, multiplicación y cría) se han mantenido más estables (MAPA, 2023).

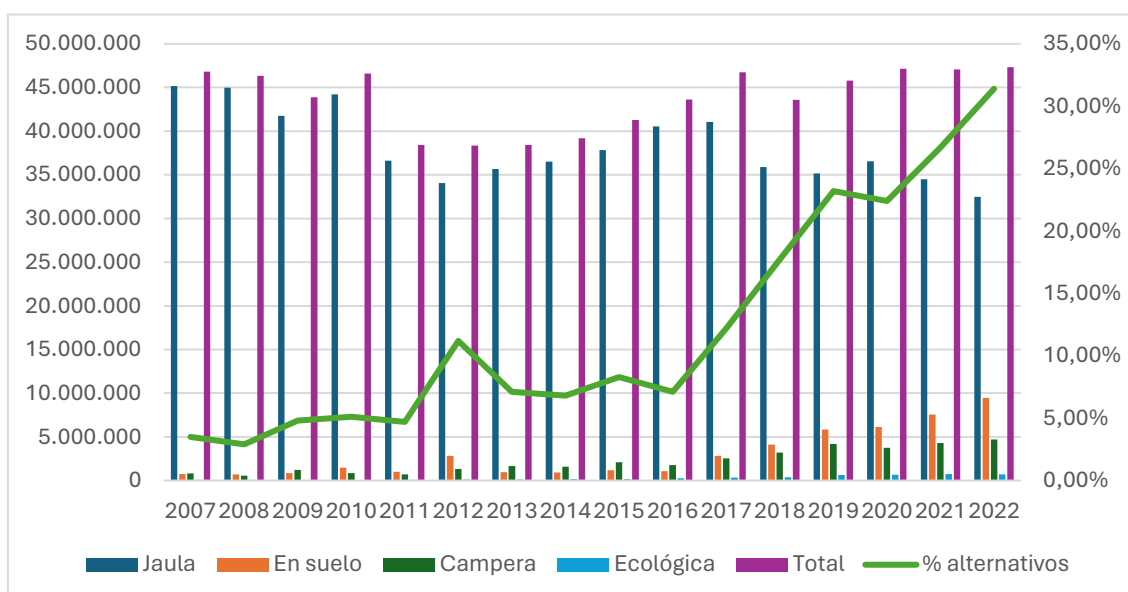
En España, la producción total de huevos de gallina en 2021 se concentra en Castilla la Mancha (con un 23,8%), Castilla y León (con un 16,9%) y en Aragón (con un 15,8%), como se observa en la figura 2.

Figura 2. Producción total de huevos de gallina en España en 2021 según Comunidades Autónomas (elaboración propia) (MAPA, 2023).



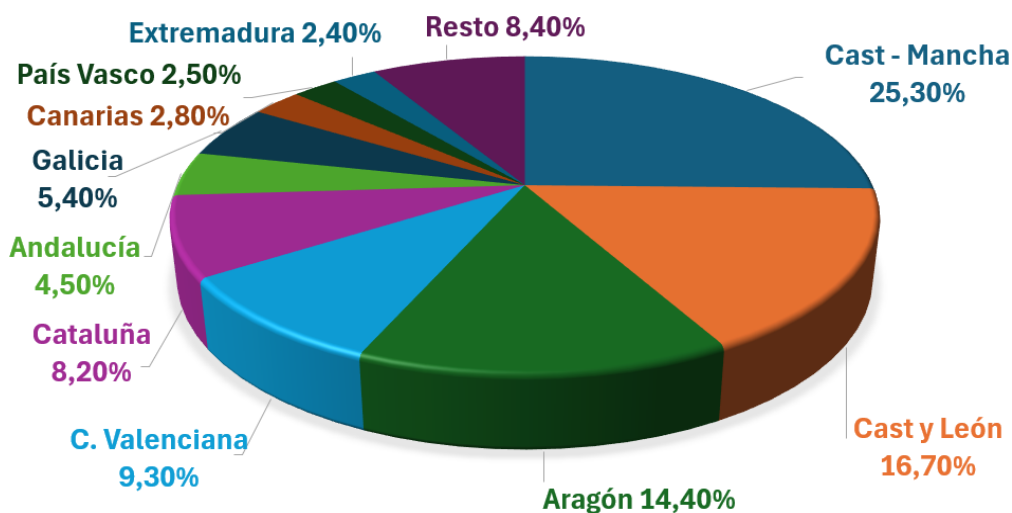
Tanto el censo de gallinas ponedoras como la producción de huevos en 2022 muestran una ligera tendencia al alza con respecto a años anteriores. El censo de gallinas de puesta criadas en sistemas de jaula ha experimentado una disminución del 5,8% con respecto al año 2021. Por otro lado, en los sistemas alternativos tanto suelo como campero se ha producido un aumento en el censo (19,9% y 9,6%, respectivamente), aunque la cría ecológica ha sufrido una reducción del 7,38% en comparación con los datos de 2021, como se aprecia en la figura 3. En 2023 el censo en sistemas alternativos supone un 31,36% del censo total, lo cual muestra una marcada tendencia al alza de este tipo de sistemas en los últimos años (MAPA, 2023).

Figura 3. Evolución de censos medios de gallinas ponedoras por sistemas de cría (elaboración propia) (MAPA, 2023).



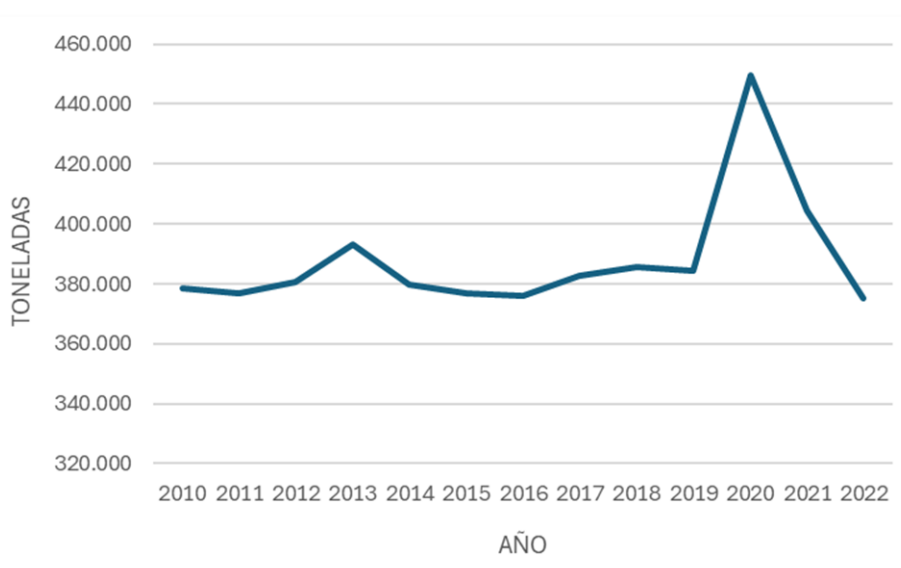
Con respecto a la distribución del censo total de gallinas ponedoras por Comunidades Autónomas, en 2021 Castilla la Mancha fue la Comunidad Autónoma con mayor censo, un 25,3%, seguida de Castilla y León con un 16,7% y de Aragón con un 14,4%, como se aprecia en la figura 4 (MAPA, 2023).

Figura 4. Censo total de gallinas ponedoras por Comunidades Autónomas en 2021 (elaboración propia) (MAPA, 2023).



Finalmente, los datos de consumo de huevo en España durante 2022 muestran una reducción respecto años anteriores, aunque cabe destacar que durante los años 2020 y 2021 se produjo un aumento significativo en el consumo derivado del confinamiento ocasionado por la pandemia. Comparado con el consumo de los últimos 10 años, la reducción es menos significativa, como se observa en la figura 5 (MAPA, 2023).

Figura 5. Evolución del consumo de huevos en hogares en toneladas (elaboración propia) (MAPA, 2023).



### 3.3. CRITERIOS DE CALIDAD DEL HUEVO

Para caracterizar su calidad, los huevos pueden someterse a evaluaciones de parámetros físicos, químicos y microbiológicos. Dentro de los parámetros físicos, según el reglamento (CE) nº 589/2008 de la Comisión de 23 de junio de 2008 por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 1234/2007 del Consejo en lo que atañe a las normas de comercialización de los huevos, los huevos de la categoría A deberán presentar las siguientes características cualitativas:

- a) cáscara y cutícula: de forma normal, limpias e intactas;
- b) cámara de aire: de altura fija no superior a 6 milímetros; no obstante, la altura de los huevos que se comercialicen con la indicación “extra” no podrá ser superior a 4 milímetros;
- c) yema: visible al trasluz solo como una sombra, sin contorno claramente discernible, que se mueva solo levemente al girar el huevo y al volver a colocarlo en una posición central;
- d) clara: transparente y traslúcida;
- e) germen: desarrollo imperceptible;
- f) materia extraña: no permitida;
- g) olor extraño: no permitido.

Con respecto a los parámetros químicos, los huevos pueden someterse a evaluaciones de calidad nutricional mediante la medición de aminoácidos, ácidos grasos esenciales (linoleico y  $\alpha$ -linolénico), vitaminas y minerales (Iannotti et al., 2014), incluyendo la determinación del perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases (Innosa et al., 2019) y de proteínas por electroforesis (Guilmineau et al., 2005).

Dentro de los principales parámetros físicos que definen la calidad del huevo se encuentran el peso del huevo, color, peso y firmeza de la cáscara, altura y densidad de albumen (unidades Haugh) y altura o índice de yema (altura/diámetro de yema), junto con el color de la yema. Las unidades Haugh informan del grado de frescura y estado de conservación del huevo y se calculan mediante la siguiente fórmula:

$$UH = 100 \times \text{Log} [H + 7,57 - (1,7 \times P^{0,37})]$$

En la misma, H indica la altura del albumen y P indica el peso del huevo (Eisen et al., 1962). De forma general, a más unidades Haugh más calidad interna del huevo. Sin embargo, la legislación europea no incluye las Unidades Haugh como índice de calidad ni da

recomendaciones al respecto. Este no es el caso de Estados Unidos, donde sí existen estándares para los huevos con cáscara (USDA, 2000):

- Huevos categoría AA: con unidades Haugh  $\geq 72$ .
- Huevos categoría A: con unidades Haugh de 60 a 71.
- Huevos categoría B: con unidades Haugh  $<60$ .

Por último, en relación con los criterios microbiológicos, en España la legislación que establece los criterios microbiológicos de las manadas de aves y de los huevos para consumo es el Reglamento (CE) nº 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de noviembre de 2003, sobre el control de la salmonela y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos. Este reglamento indica las medidas a realizar en caso de detección de *Salmonella enteritidis* o *Salmonella typhimurium* en manadas de aves con el objetivo de garantizar la salud pública.

### 3.4. EL ESTRÉS EN AVICULTURA

El bienestar animal hace referencia al estado físico y mental de un animal en relación con las condiciones en las que vive y muere. Un animal se encuentra en buen estado de bienestar si está sano, bien alimentado, en un ambiente seguro y cómodo, es capaz de expresar un comportamiento innato y si no sufre experiencias desagradables tales como dolor o miedo (WOAH, 2024). Algunos comportamientos indicadores de bienestar en aves son el acicalamiento, el baño de arena (figura 6) o escarbar en la yacija (Costa et al., 2012).



Figura 6. Gallinas tomando un baño de arena.

El estrés en avicultura hace referencia a la respuesta fisiológica y comportamental que las aves experimentan ante situaciones desafiantes o amenazantes en su entorno. Algunos factores que pueden causar estrés más frecuentemente son temperatura o humedad

inadecuada, ventilación insuficiente, carencia de nutrientes en el pienso, exceso de densidad, unión de lotes diferentes (establecimiento de jerarquías), transporte, vacunaciones, ruidos fuertes, manejo agresivo o enfermedades y lesiones (pododermatitis, prolapsos...) (Du et al., 2022).

El estrés conlleva a una pérdida económica debida al incremento de los gastos en la alimentación (por aumento del consumo de pienso y agua), a la disminución de la resistencia a enfermedades y a la reducción en la producción de huevos (Mumma et al., 2006). El picaje, la histeria y los amontonamientos son claros indicadores de estrés en las gallinas. Entre estos, el picaje se destaca como uno de los principales desafíos tanto económicos como de bienestar en el sector avícola de puesta, pues las aves tienen una tendencia natural a imitar a las demás de su alrededor. Así, cuando un animal del lote comienza el picaje severo, especialmente en los sistemas libres de jaula, el picaje de plumas y el consiguiente canibalismo puede extenderse rápidamente por imitación social causando una elevada mortalidad (Bist et al., 2023; Kittelsen et al., 2022; Zeltner et al., 2000).

Por otro lado, la histeria se debe a la elevada percepción del miedo que poseen las gallinas, de tal forma que, en los aviarios, ante ruidos, depredadores o avicultores agresivos las aves vuelan unas sobre otras de forma descontrolada hasta que algún objeto las detiene. Muchas de ellas se lesionan durante este comportamiento: se rompen quillas, uñas, alas, se arrancan plumas, se posan unas sobre otras y se producen amontonamientos, muriendo muchas asfixiadas. También es posible encontrar heridas, hematomas y fracturas de huesos (Heerkens et al., 2016), pues las grandes y altas infraestructuras que se encuentran en los aviarios aumentan el riesgo de lesiones en las aves por posibles caídas desde los últimos niveles (Stratmann et al., 2019).

En lo referente al establecimiento de jerarquías, en los sistemas de jaula, donde los grupos son lo suficientemente pequeños, las jerarquías se establecen rápidamente y las agresiones suelen ser raras. Sin embargo, cuando el tamaño del grupo es grande, como ocurre en los sistemas de aviario, las jerarquías se establecen constantemente, por lo que las agresiones son más frecuentes y el estrés aumenta (Rufener et al., 2018).

Con respecto a la comparación entre los sistemas de cría en suelo y en jaula enriquecida, Tauson (2002) afirma que las aves en los sistema de aviario pueden sufrir brotes inesperados de canibalismo, por lo que los aviarios son menos predecibles productivamente que las jaulas enriquecidas. Villagrà et al. (2003) afirman que la mortalidad en gallinas de puesta criadas en aviario es superior que en las criadas en jaulas, tanto convencionales como enriquecidas.

Heerkens et al. (2015) también afirman que el picaje y los niveles altos de mortalidad son problemas significativos en los sistemas libres de jaula.

Sin embargo, Schuck-Paim et al. (2021) afirman que, gracias a la experiencia acumulada en la cría en aviarios desde que estos surgieron, la mortalidad de estos sistemas ha ido disminuyendo una media de 0,35 a 0,65% anual desde el año 2000, de tal modo que en los últimos años las diferencias en la mortalidad entre sistemas de jaula enriquecida y aviarios no son significativas. De modo similar, Aerni et al. (2005) observaron que la tasa de mortalidad y canibalismo no difiere significativamente entre los dos sistemas de cría: suelo y jaula enriquecida. Sin embargo, también comprobaron que las gallinas criadas en aviario consumen más pienso que las gallinas enjauladas y que su índice de conversión es mayor, hecho también corroborado por Ahammed et al. (2014). Estos datos indican que los animales criados en sistemas de suelo tienen unos costes de producción superiores que los criados en jaulas y, que están, por lo general, sujetos a condiciones que requieren más gasto de energía y/o más estresantes, razón por la cual el presente experimento se centra en investigar la posible mejora en el bienestar animal y en la producción de animales criados en aviario.

Puvadolpirod y Thaxton (2000) estudiaron la respuesta al estrés en pollos de engorde mediante la administración continua de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) durante 7 días. La ACTH es producida por la hipófisis y desencadena la producción de cortisol en las glándulas suprarrenales. La ACTH causó aumentos en la corticosterona plasmática, la glucosa, el colesterol, los triglicéridos, las lipoproteínas de alta densidad (HDL), las proteínas totales y la relación heterófilo/linfocito (por un aumento del número de heterófilos). El peso corporal, así como los pesos relativos de los principales órganos inmunológicos (es decir, bazo, timo y bolsa de Fabricio), disminuyeron. Finalmente, el hígado aumentó debido a la acumulación de lípidos y humedad.

La corticosterona es el glucocorticoide aviar predominante y un símbolo de la respuesta de la glándula adrenal al estrés en las aves (Wang et al., 2017). Post et al (2003) estudiaron la respuesta al estrés también de pollos de engorde administrando, en este caso, corticosterona. La misma redujo el crecimiento corporal y del bazo, aumentó el recuento de heterófilos y disminuyó la formación de anticuerpos contra glóbulos rojos de oveja inoculados.

La disminución del peso del bazo, timo y bolsa de Fabricio junto con una disminución en la producción de anticuerpos es indicativo de inmunosupresión en el animal. El aumento de heterófilos puede ocurrir por procesos infecciosos o por niveles elevados de cortisol. El recuento

de heterófilos y la ganancia de peso son importantes para evaluar tanto el bienestar animal de las aves como la eficiencia económica del método de producción (Madec et al., 2008b).

Mumma et al. (2006) en otro ensayo de inoculación de ACTH, esta vez en gallinas, obtuvieron resultados semejantes: el peso de los intestinos y del hígado aumentó, al igual que los niveles de corticosterona, glucosa, colesterol y lipoproteínas de alta densidad. Los consumos de agua y pienso también aumentaron, mientras que los niveles de triglicéridos en sangre disminuyeron. El peso del bazo y los niveles de anticuerpos ante los hematíes ovinos disminuyeron, mientras que la relación heterófilo/linfocito aumentó. La reproducción en las gallinas también fue afectada negativamente por el tratamiento con ACTH, de tal forma que la puesta cesó en el tercer día de tratamiento, observándose folículos atrésicos y disminución del peso del oviducto en las gallinas tratadas con ACTH. El metabolismo de los animales ante situaciones de estrés evoluciona a un estado catabólico por la movilización de lípidos y proteínas desde el tejido adiposo y el músculo hasta el hígado e intestinos. La disminución de la puesta y el aumento del consumo de pienso son consecuencias del exceso de grasa corporal inducido por el aumento de la corticosterona en respuesta a un estímulo estresante (Wang et al., 2017).

Estos resultados indican que el estrés en las ponedoras afecta significativamente a los resultados productivos y a la salud de los animales, lo que resulta en un aumento del consumo de pienso, una reducción de la producción de huevos, un posible aumento de la susceptibilidad a enfermedades y una disminución de las ganancias económicas (Mumma et al., 2006), por lo que es de especial interés comprobar si la ausencia de estrés de los animales (o la prevención del mismo mediante el uso de feromonas maternas) también repercute en la calidad de los huevos producidos.

### 3.5. FEROMONAS MATERNALES DE GALLINA

Las feromonas son compuestos biológicamente activos liberados por un individuo y percibidos por otro individuo de la misma especie. La recepción de estas feromonas puede desencadenar una respuesta específica en el segundo individuo, que puede afectar su comportamiento o su fisiología (Tirindelli et al., 2009). Un tipo de feromonas son las tranquilizantes aviarias, que son capaces de disminuir el estrés, la ansiedad y la agresividad (Pageat, 2005).

Las feromonas de las aves proceden de la secreción de la glándula uropigial de estas (figura 7), la cual está ubicada dorsalmente entre la cuarta vértebra caudal y el pigóstilo. Esta secreción consiste en una sustancia cerosa compuesta por una mezcla de ácidos grasos y ésteres (Sandilands et al., 2004) que permite que las plumas sean repelentes al agua, mantiene la hidratación del pico y de la piel y



*Figura 7. Glándula uropigial de gallina.*

previene de infecciones bacterianas (Pageat, 2005), pues limita el crecimiento excesivo de bacterias de la piel (Shawkey et al., 2003). También limita la vida de ectoparásitos in vitro, aunque no se ha demostrado que esto también ocurra in vivo (Moyer et al., 2003). Tampoco es seguro que controle la proliferación de dermatofitos en la piel (Moreno-Rueda, 2017). La secreción de la glándula la extiende el propio animal sobre su cuerpo durante el acicalamiento y aumenta conforme a la edad del ave (Sandilands et al., 2004).

Kolattukudy y Rogers (1987) afirman que la glándula en las hembras de pato durante la temporada de reproducción está involucrada en la producción y secreción de feromonas sexuales. Sin embargo, las feromonas sexuales, que son producidas en diferentes aves solo durante la temporada de apareamiento, actúan como atrayentes o estimulantes sexuales, y no se pueden utilizar como feromonas tranquilizantes que actúen para calmar, apaciguar, o aliviar la ansiedad debida al estrés. Además, la composición química de las feromonas sexuales es diferente de las feromonas tranquilizantes de aves. Las feromonas tranquilizantes de gallina se componen de ácido láurico (13%), ácido palmítico (40%), ácido linoleico (34%) y ácido oleico (13%) (Pageat, 2005), mientras que las feromonas sexuales de pata se componen de derivados hidroxiácidos de los ácidos láurico, cáprico y caprílico (Kolattukudy y Rogers, 1987). Para conocer esta composición se partió de gallinas reproductoras que eran seguidas por su descendencia, se frotó con una compresa la glándula uropigial y mediante cromatografía de gases y espectroscopía de masas se analizó la composición de la secreción. Posteriormente y basándose en los resultados se sintetizó en laboratorio una feromona artificial, la cual puede administrarse sobre las paredes de las naves, las plumas, la piel del animal o en el aire (Pageat, 2005).

Se sabe que la presente feromona tiene un efecto apaciguante en las aves, y se puede utilizar para aliviar estrés y la ansiedad (disminución del cortisol salivar), reducir el

comportamiento agresivo (menor número de heridas en las canales), mejorar la ganancia de peso y mejorar la producción de huevos (Pageat, 2005). Madec et al. (2008a) demostraron que en pollos de engorde el uso de feromonas durante la cría resulta en un mayor peso canal y menor número de cicatrices por arañazos en las canales. En otro estudio Madec et al. (2008b) mostraron que los pollos tratados con feromonas tenían una tasa de crecimiento promedio más alta, una proporción heterófilo/linfocito más baja y un nivel de corticosterona más bajo, por lo que concluyeron que la difusión constante de feromonas podría mejorar el bienestar y el crecimiento de las aves al reducir el estrés.

En otro estudio se sometieron a gallinas y gallos a condiciones estresantes de luz brillante, ruidos metálicos y descargas eléctricas. No se observó una diferencia de peso significativa entre el lote tratado con feromonas tranquilizantes y el lote tratado con placebo, aunque los niveles de cortisol y de T4 mostraron una tendencia tranquilizante en el lote con tratamiento. También se observó que las hembras son significativamente más sensibles al estrés y a la feromona que los machos, demostrado por un mayor nivel de cortisol y de T4 en el lote placebo y por una mayor reducción en los niveles de ambas hormonas en el lote tratado con feromona con respecto a los machos (Pageat, 2005).

## 4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El sector de la avicultura de puesta es un pilar económico importante en España y en Europa, pues proporciona un alimento de calidad a la vez que genera empleo y fija población en áreas rurales.

La sociedad actual reclama huevos de gallinas criadas en sistemas libres de jaula, como son los sistemas de suelo, los cuales han ido creciendo significativamente en los últimos años. En estos sistemas, por lo general, se presentan mayores niveles de mortalidad (aunque han disminuido considerablemente en los últimos años) y las gallinas poseen mayores requerimientos energéticos que las criadas en jaula. Estos hechos reflejan condiciones estresantes para los animales, las cuales provienen principalmente del establecimiento constante de jerarquías, de la fácil diseminación del picaje por toda la nave cuando este aparece y el mayor número de lesiones en los animales como consecuencia de las instalaciones. Estas condiciones pueden afectar negativamente a los índices productivos y a la calidad del producto final: el huevo. Debido a ello, es necesario mejorar el bienestar animal, reducir la mortalidad y aumentar los rendimientos productivos en los sistemas libres de jaula.

En los pollos de engorde, el estrés puede ser modulado mediante el uso de feromonas, por lo que resulta interesante investigar si este método es también efectivo en las gallinas ponedoras y si influye en la calidad de los huevos.

El objetivo del presente proyecto consiste en analizar el efecto que el uso de feromonas maternas apaciguadoras sintéticas aviarias pueda tener en el comportamiento y el rendimiento productivo de gallinas ponedoras, así como en la calidad del huevo producido.

## 5. METODOLOGÍA

El presente estudio ha sido aprobado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (PD07/23; PI71/23). Se desarrolló en dos ubicaciones diferentes: una granja comercial, Granja San Miguel S.A.T. (desde mayo a julio de 2023, durante 13 semanas, con un total de 840 huevos analizados) y una granja experimental, el Servicio de Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza (desde enero a marzo de 2024, durante 13 semanas, con un total de 960 huevos analizados). En ambos estudios se usaron gallinas de la estirpe Lohmann.

En Granja San Miguel se disponía de 4 naves para el estudio, con 100.00 - 110.000 aves en cada una. Dos de ellas se encuentran en Villarreal de Huerva (Zaragoza) y otras dos en Ferreruela de Huerva (Teruel). En cada localidad, una de las naves era de gallinas de 36 semanas y otra de 57 semanas, las cuales al finalizar el experimento tuvieron 48 y 69 semanas respectivamente. En las naves de Villarreal de Huerva se colocaron recipientes con un gel de liberación lenta de feromonas maternas SecurePoultry® de SIBPMA, a razón de uno por cada 50 m<sup>3</sup>, de modo que el viento predominante de la zona no permitía que la feromona llegase a las naves control (las ubicadas en Ferreruela de Huerva, las cuales estaban separadas 15 km de las naves con feromonas). El sistema de crianza de todas las naves era de suelo y la alimentación se basaba en una harina cuya composición correspondía a la adecuada según la edad del animal.

A lo largo de las trece semanas que duró el experimento se analizó la calidad de 30 huevos de cada nave cada dos semanas en el mismo día de puesta. Dicho análisis consistió en mediciones con un equipo EQM® Eggware 400 de TSS del color de cáscara (por reflectometría, figura 8), peso del huevo (con una balanza de



Figura 8. Medidor de color de cáscara por reflectometría.

sensibilidad de 0,1 gramos), unidades Haugh (cuyo cálculo depende del peso del huevo y de la altura de albumen obtenida con un micrómetro automático, el cual se muestra en la figura 9), color de la yema (mediante patrón Roche) y tamaño de manchas de sangre y carne. Dichas mediciones se realizaron en el laboratorio del departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.



*Figura 9. Micrómetro automático medidor de la altura del albumen sobre*

Las manchas de sangre y carne se evaluaron mediante escala, con un 0 si no se apreciaba a simple vista ninguna mancha, con un 1 si la mancha era menor o igual a 2 mm (figuras 10 y 11) y con un 2 si era mayor de 2 mm (figura 12 y 13).



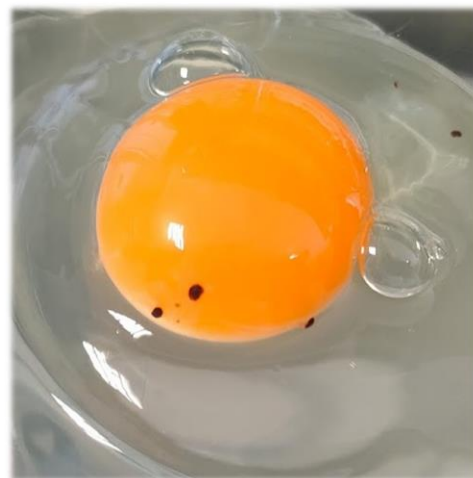
*Figura 10. Mancha de carne en albumen tamaño 1.*



*Figura 11. Mancha de sangre en yema tamaño 1.*

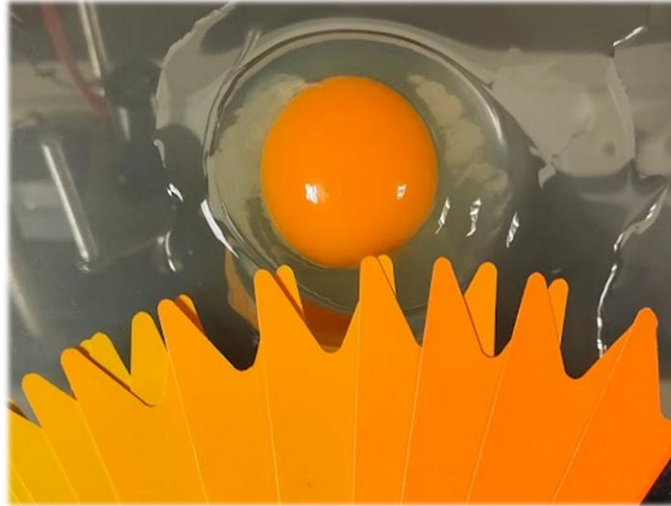


*Figura 12. Mancha de carne en albumen tamaño 2.*



*Figura 13. Mancha de sangre en yema tamaño 2.*

En la figura 14 se muestra la valoración del color de la yema mediante comparativa visual de la misma con la escala de colores de Roche, la cual relaciona un tono determinado de yema con un valor numérico en una escala de 1-15, de menor a mayor intensidad de color, desde el amarillo pálido hasta el naranja oscuro.



*Figura 14. Escala de Roche para el color de la yema.*

En la Facultad de Veterinaria se utilizaron dos naves pertenecientes al Servicio de Experimentación Animal (naves 32 y 19). Cada nave constaba de 4 boxes (figura 15), con 10 gallinas jóvenes en cada box. En una de las naves se administraron las mismas feromonas maternas que en el estudio en granja (las cuales se encontraban en una matriz de liberación lenta al ambiente) y en la otra no (figura 16). En ambas naves existían hojas de registro del número y peso de huevos puestos por box y día y las temperaturas máximas y mínimas de cada día.



*Figura 15. Nave con 4 boxes y difusores de feromonas en la reja.*



*Figura 16. Box de la nave sin feromonas con 10 gallinas.*

La temperatura fue constante alrededor de 20°C en ambas naves, las horas de luz fueron de 16 al día, respetándose las ocho horas de oscuridad ininterrumpidas como recomienda el Real Decreto 3/2002, de 11 de enero, por el que se establecen las normas mínimas de protección de las gallinas ponedoras. Los luxes durante el periodo de suplementación con luz artificial (de 4:00 a 9:00 horas y de 16:00 a 20:00 horas) fueron 25 en la nave sin feromonas y 35 en la nave con feromonas. Durante el día, la luz natural ofrecía una potencia lumínica de 15 luxes.

En este estudio se analizaron nuevos datos de calidad de huevo no analizados en el experimento anterior, tales como firmeza, peso, grosor y relación peso/superficie de la cáscara (o densidad de cáscara) (Hunton, 2005). Al igual que en el experimento anterior, también se analizó el color de la cáscara, peso del huevo, unidades Haugh, color de la yema y tamaño de manchas de sangre y carne, todo ello utilizando el equipo EQM®. Para conocer la firmeza de la cáscara se utilizó un texturómetro Bröring FEST (figura 17).



Figura 17. Medidor de la firmeza de la cáscara por resistencia a la rotura.

Para valorar peso de cáscara y grosor se desecaron las mismas 24h en una estufa (Memmert® BE-500) a 85°C. El grosor de la cáscara se cuantificó con un micrómetro digital para cáscaras de huevo (figura 18) y su valor final fue la media de tres medidas tomadas en la sección ecuatorial del huevo.

Por otro lado, en este experimento se valoró el comportamiento de los animales mediante la colocación de acelerómetros (ActiGraph® wGT3X-BT) (figura 19) en dos gallinas por box utilizando un arnés especial para aves (figura 20) durante 8 días.



Figura 18. Micrómetro digital medidor del grosor de la cáscara.



*Figura 19. Acelerómetro colocado en el arnés.*



*Figura 20. Gallina con arnés y acelerómetro.*

Los resultados se han analizado estadísticamente con el software SPSS 26.0 con un Análisis de Varianza mediante un Modelo Lineal General para los efectos de la edad y del uso de feromonas en la prueba en granja comercial y para el efecto del uso de feromonas en el SEA. Además, se ha realizado un test de medias para los valores paramétricos (color, peso, firmeza y grosor de cáscara, color de yema, unidades Haugh y peso de huevo, los cuales siguieron una distribución normal) y la prueba de Kruskal-Wallis para los valores no paramétricos (manchas de carne y sangre). En los análisis estadísticos se consideraron valores de  $P < 0,05$  como significativos.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. GRANJA COMERCIAL

Tras analizar los huevos procedentes de Granja San Miguel, se compararon los resultados de los cuatro grupos de huevos (gallinas jóvenes y adultas con y sin feromonas) y se obtuvieron los resultados medios de cada parámetro y su significación, datos reflejados en la tabla 1.

Tabla 1. Valores medios ( $\pm$  desviación estándar) y significación en Granja San Miguel.

	FEROMONA		EDAD		Significación		
	NO	SÍ	36 sem	57 sem	FEROMONA	EDAD	FEROMONA x EDAD
Color de cáscara	28,9 $\pm$ 4,24	28,9 $\pm$ 4,46	28,0 $\pm$ 3,61	29,8 $\pm$ 4,81	0,858	<0,001	0,987
Peso (g)	62,5 $\pm$ 4,83	64,4 $\pm$ 4,55	63,6 $\pm$ 4,66	63,4 $\pm$ 4,91	<0,001	0,481	<0,001
UH	96,2 $\pm$ 7,22	96,3 $\pm$ 9,4	97,4 $\pm$ 7,04	95,1 $\pm$ 9,4	0,919	<0,001	0,744
Color de yema	12,3 $\pm$ 1,17	12,3 $\pm$ 1,1	12,5 $\pm$ 1,1	12,1 $\pm$ 1,15	0,432	<0,001	0,288
<i>n</i>	418	419	419	418			

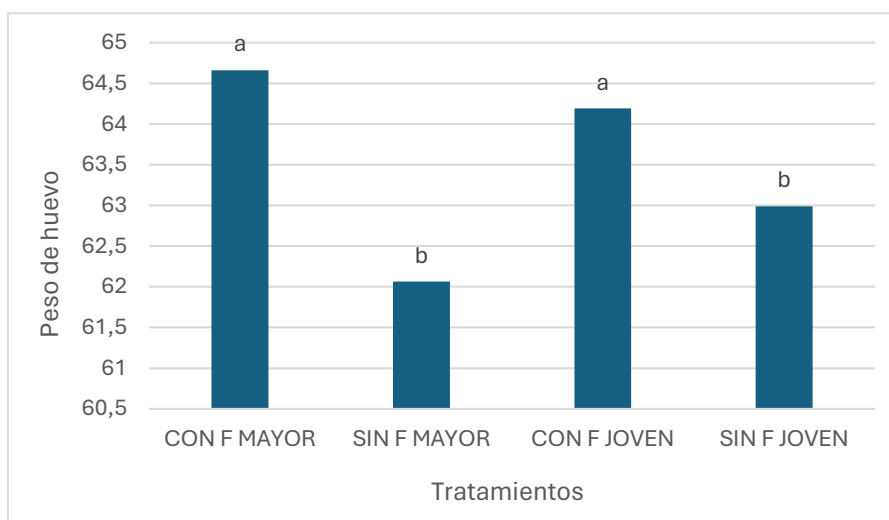
Mediante la significación estadística se deduce que el color de la cáscara no se ve afectado por el uso de feromonas, pero sí por la edad del animal, siendo la cáscara más oscura en animales jóvenes. En concreto, la intensidad de la reflexión de la luz de los huevos de las gallinas jóvenes fue de media 1,82 puntos menor en claridad que en el caso de las gallinas mayores, por lo que se trata de una cáscara más oscura. Este hecho está contrastado por Odabasi et al. (2007), quienes afirman que el pigmento que una gallina sintetiza para depositarlo en la cáscara del huevo es constante a lo largo de toda su vida, y dado que el tamaño de huevo aumenta proporcionalmente a la edad del animal, este pigmento se diluye, quedando una cáscara de un color menos intenso en las gallinas de más edad. Además, observaron que, tras corregir el color de la cáscara para el peso del huevo, la variabilidad en la pigmentación fue escasa.

El principal pigmento en las cáscaras de huevo de las gallinas ponedoras de huevos morenos es la protoporfirina IX, que es un precursor de la hemoglobina, el cual se sintetiza y deposita en el útero. La coloración morena de la cáscara es uno de los parámetros indicadores de calidad de cáscara y tiene una influencia positiva en la preferencia del consumidor. La cantidad de pigmento depositado en la cáscara está influenciada principalmente por la genética de la gallina, aunque también puede verse afectada por la edad de la gallina, la dieta, el sistema de alojamiento, los factores estresantes y ciertas enfermedades como la bronquitis infecciosa (Samiullah et al., 2015). Factores de estrés, como el diseño de la jaula, la alta densidad de la jaula, el miedo y las perturbaciones frecuentes, pueden hacer que las gallinas ponedoras de huevos morenos pongan cáscaras de huevo de color más claro (Walker y Hughes, 1998). Además, si tales perturbaciones ocurren poco antes de la oviposición, el huevo se retiene en el útero y se produce un recubrimiento adicional de calcio, lo que enmascara el color propio de la cáscara (Hughes et al., 1986).

En lo referente al peso del huevo, según el presente estudio, este resultó ser significativamente más alto en gallinas tratadas con feromonas, concretamente 1,9 g más por huevo de media. Sin embargo, este efecto puede haber estado influenciado por más factores, puesto que el peso del huevo resultó ser semejante entre edades ( $P > 0,05$ ), cuando los huevos procedentes de gallinas de más edad deberían ser de mayor tamaño y peso que los procedentes de gallinas jóvenes (Silversides & Scott, 2001; Sokołowicz et al., 2018). Debido a esta falta de correlación del peso del huevo con la edad de la gallina es probable que los huevos recogidos durante esta prueba no fueran escogidos al azar, sino que el personal encargado de tomar la muestra escogiera voluntariamente los huevos de mayor tamaño, lo cual compromete las conclusiones obtenidas.

La interacción entre feromona y edad resultó influir significativamente sobre el peso del huevo, pues en este análisis las gallinas mayores con feromonas obtuvieron un peso de huevo 2,6 g mayor que las de la misma edad sin feromonas, mientras las gallinas jóvenes con feromonas solo obtuvieron 1,2 g más que las gallinas jóvenes sin feromonas, tal y como se muestra en la figura 21. En ella se observa que los pesos de huevo de las gallinas jóvenes tratadas con feromonas son significativamente semejantes a los pesos de huevo de las gallinas mayores con feromonas. Lo mismo ocurre con los pesos de las gallinas sin feromonas, pues los huevos de gallinas jóvenes sin feromonas no se diferencian significativamente de los pesos de las gallinas mayores sin feromonas. El mayor incremento de peso en las gallinas de más edad tras el uso de las feromonas indica que el tratamiento puede tener un mayor efecto en gallinas de más edad.

Figura 21. Peso de huevo según tratamientos.



Las unidades Haugh de los huevos de gallinas jóvenes fueron significativamente mayores (2,28 unidades) que las de los huevos de gallinas de más edad, indicando una mayor calidad en gallinas jóvenes, tal y como se anticipaba en base a los conocimientos generados de experiencias previas (Silversides & Scott, 2001; Sokołowicz et al., 2018). Excluyendo la enfermedad, el factor más importante que afecta la calidad del albumen de los huevos frescos es la edad de la gallina (Jacob et al, 2000). Este hecho es debido al menor contenido en ovomucina, ovotransferrina y globulinas del albumen en huevos de gallinas mayores, pues el porcentaje de proteína del albumen disminuye conforme aumenta la edad de la gallina (Vilela et al., 2016). La ovomucina es una proteína importante en el mantenimiento de la viscoelasticidad natural del albumen. y puede ser utilizado como un indicador de la frescura del huevo (Wang et al., 2019). Solo el 1,5 al 3,5% del total de proteínas en el albumen es ovomucina, y otras proteínas como la globulina y la ovotransferrina tienen propiedades espumantes casi tan buenas como las de la ovomucina, pero constituyen una proporción mucho mayor del albumen (Silversides & Scott, 2001).

Por último, en lo referente al color de la yema, este fue significativamente más oscuro (0,38 unidades mayor) en las gallinas jóvenes, lo cual puede explicarse por una posible mayor facilidad de absorción del pigmento de estas o por el tipo de pienso que consumen (Nys, 2000), pues en el experimento los animales comen pienso de distinta composición según la edad. Sin embargo, en otros estudios (Marzec et al., 2019; Sokołowicz et al., 2018; Yenilmez y Atay, 2023) no se ha encontrado correlación entre la edad de las gallinas y el color de la yema.

Los resultados de las manchas de carne y sangre, reflejados en porcentaje en la tabla 2, muestran que la mayoría de los huevos no tenían ninguna mancha en todos los grupos. Sin embargo, las gallinas tratadas con feromonas pusieron más huevos sin manchas de carne que las gallinas no tratadas con feromonas, y las gallinas jóvenes un más huevos sin manchas de carne que las gallinas mayores. En cuanto a las manchas de sangre, las gallinas tratadas con feromonas pusieron más huevos sin manchas de sangre, mientras que las gallinas jóvenes pusieron más huevos sin manchas de sangre en comparación con las gallinas mayores.

Tabla 2. Porcentaje de huevos con manchas de sangre y carne según efecto en Granja San Miguel.

		FEROMONA		EDAD	
		NO	SÍ	36 sem	57 sem
Manchas de carne (%)	0	69,9	74,2	74,5	69,6
	1	22,2	15	17,4	19,9
	2	7,9	10,07	8,1	10,5
Manchas de sangre (%)	0	62,0	62,5	68,3	56,2
	1	33,5	31,7	26,5	38,8
	2	4,5	5,7	5,02	5,0

Al tratarse de un conjunto de datos no paramétricos, para analizar las manchas se usó la prueba de Kruskal-Wallis. Con respecto al uso de feromonas, la prueba reveló que la distribución de manchas de carne entre uso y no uso de feromona no varía, de tal modo que la feromona no tiene influencia sobre la presencia y el tamaño de las manchas de carne con una significación del 0,32. Lo mismo ocurre con las manchas de sangre, las cuales no dependen del uso de feromonas, como revela la significación del 0,97 obtenida.

En el caso del efecto de la edad, la prueba reveló que las manchas de carne tienen tendencia a ser de menor tamaño en los huevos de gallinas jóvenes con una significación del 0,10. En el caso de las manchas de sangre sí hay una diferencia significativa entre edad, pues las gallinas jóvenes pusieron huevos con manchas de sangre de menor tamaño que las gallinas de 57 semanas ( $P= 0,001$ ). Sin embargo, Yenilmez y Atay (2023) en otro estudio observaron que en un grupo de gallinas al aumentar la edad había significativamente más manchas de carne, pero

las manchas de sangre no variaron. Smith y Musgrove (2008) afirmaron que las manchas de sangre están definidas por la genética y por factores nutricionales, como carencia de vitamina A en la dieta, aunque si estas condiciones se hubieran dado en el presente experimento las manchas de sangre observadas hubieran sido más llamativas. Sokołowicz et al. (2018) afirman que el genotipo del animal afecta a los rasgos del contenido del huevo como la altura de la clara, las unidades Haugh y la presencia de manchas de carne y sangre. En consecuencia, se concluye que la presencia de manchas puede variar ligeramente en porcentaje entre lotes de animales de la misma edad, pero si el número y tamaño de estas no aumenta significativamente en un breve periodo de tiempo y concuerda con lo esperado en base al historial de la explotación, no se considera un problema grave. El número y tamaño de manchas de carne y sangre pueden aumentar con la edad del animal.

Química y nutricionalmente los huevos con manchas de sangre y carne no suponen ningún riesgo y son aptos para su consumo. Las manchas de sangre son el resultado de la hemorragia de un pequeño vaso sanguíneo en el ovario u oviducto. Si la mancha de sangre está en la yema, es probable que la hemorragia haya ocurrido en el ovario durante la ovulación o en el infundíbulo del oviducto antes de que se forme el albumen. Si la mancha de sangre está en la clara, es probable que la hemorragia haya ocurrido en la pared del magno del oviducto. Las manchas de carne, en cambio, son fragmentos sueltos de tejido ovárico u oviductal incluidos en la clara (Jacob et al, 2000).

## 6.2. GRANJA EXPERIMENTAL

### 6.2.1. CALIDAD DE HUEVO

Con respecto al experimento llevado a cabo en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA), los resultados se muestran en la tabla 3. Con un ANOVA y mediante el programa SPSS se compararon los resultados de los dos grupos de huevos (gallinas jóvenes con y sin feromonas) y se obtuvieron los resultados medios de cada parámetro y su significación.

Tabla 3. Valores medios ( $\pm$  desviación estándar) y significación en Granja SEA.

	FEROMONAS		Significación
	SIN	CON	
Peso de huevo (g)	62,11 $\pm$ 5,51	61,73 $\pm$ 4,98	0,274
Unidades Haugh	95,88 $\pm$ 6,51	96,61 $\pm$ 6,37	0,029
Color de yema	13,22 $\pm$ 0,99	13,01 $\pm$ 0,94	<0,001
Color de cáscara	26,54 $\pm$ 4,7	26,06 $\pm$ 4,4	0,024
Firmeza de cáscara (N)	56,48 $\pm$ 9,24	55,01 $\pm$ 9,3	0,018
Peso de cáscara (g)	6,34 $\pm$ 0,58	6,12 $\pm$ 0,6	<0,001
Espesor de cáscara ( $\mu$ m)	423,69 $\pm$ 27,6	412,34 $\pm$ 28,69	<0,001
Densidad de cáscara (mg/cm <sup>2</sup> )	86,54 $\pm$ 7,05	83,86 $\pm$ 7,04	<0,001
% de cáscara	10,22 $\pm$ 0,73	9,92 $\pm$ 0,77	<0,001

En este experimento todos los parámetros analizados, excepto el peso de huevo, resultaron ser significativamente dependientes del uso de feromonas ( $P < 0,05$ ). El peso del huevo, en comparación con el experimento en Granja San Miguel, no resultó ser significativamente diferente según el tratamiento. Las unidades Haugh fueron 0,73 unidades mayores en los huevos provenientes de gallinas con feromonas, lo cual nos indica una mayor calidad interna en estos huevos. El resto de parámetros (color de yema y color, firmeza, peso, espesor, densidad y porcentaje de cáscara) fueron significativamente mayores en los huevos provenientes de gallinas sin feromonas. Según los datos analizados, se observa que las feromonas pueden interferir en la fisiología del animal repercutiendo en la deposición de calcio en la cáscara, en la producción de ovomucina del albumen y en la facilidad o dificultad de depositar color en la yema del huevo.

Las unidades Haugh del albumen disminuyen significativamente conforme pasan los días de almacenaje tanto a temperatura ambiente como en refrigeración, aunque con una mayor pendiente negativa para los huevos a temperatura ambiente (Chung & Lee, 2014; Samli et al., 2005). Este hecho sucede porque las enzimas presentes en el albumen hidrolizan las cadenas de aminoácidos, destruyendo la estructura proteica y liberando agua ligada a grandes moléculas de proteínas, lo que hace que el albumen pierda consistencia y viscosidad a lo largo del tiempo de almacenamiento y las unidades Haugh disminuyan (Lana et al., 2018). Sin embargo, este suceso

no fue la causa de que los huevos recogidos de la nave sin feromonas en el presente experimento obtuvieran unidades Haugh menores, pues todos los huevos fueron analizados dentro de las cinco horas siguientes a su puesta, tiempo no suficiente para que el albumen se altere.

Ante la sospecha de que las características ambientales propias de cada grupo de animales como cantidad de luz ambiental, temperatura de las naves, densidad animal o genética individual pueden haber interferido en estos resultados, se considera conveniente un estudio cruzado en el que el grupo control pase a ser el grupo con feromonas y viceversa. Igualmente es conveniente un experimento en el que se sometan a ambos grupos de gallinas a condiciones ambientales estresantes tales como inadecuada intensidad lumínica, temperatura o humedad relativa para observar así el comportamiento y los índices productivos de las gallinas en estas circunstancias.

De hecho, en este experimento el sistema de calefacción de la nave de animales sin feromonas dejó de funcionar al inicio del experimento, lo cual tuvo que solucionarse mediante la instalación de calefactores eléctricos enchufables. Este cambio en las condiciones ambientales pudo afectar a las características de la cáscara de los huevos, pues Tumová y Gous (2012) afirmaron que la forma del huevo es afectada significativamente por la temperatura de crianza de los animales, lo cual repercute directamente en la resistencia de la cáscara (Rodríguez-Navarro et al., 2002).

Sokołowicz et al. (2018) demostraron que el genotipo y la edad de la gallina tienen influencia en el color, el peso y el grosor de la cáscara del huevo. En el presente estudio todas las gallinas eran de la misma edad, pero el genotipo individual puede haber sido determinante también en los resultados obtenidos.

La resistencia (o firmeza) de la cáscara del huevo puede verse afectada por muchos factores, tales como la forma de la cáscara, grietas minúsculas y anomalías en la estructura. Además, las cáscaras de huevo de gallinas mayores tienen una menor resistencia a la rotura (menos de la mitad que en el caso de las gallinas jóvenes) y muestran una mayor variabilidad en el grosor y la morfología microscópica (Rodríguez-Navarro et al., 2002). Estos son los resultados que se habrían esperado en caso de haber analizado la firmeza de la cáscara en los huevos procedentes de la granja comercial, donde se disponía de gallinas de distintas edades.

En caso de haber analizado huevos de gallinas ligeras (blancas), se habría esperado que sus cáscaras fueran de peor calidad que las de los huevos analizados, pues Rayan et al. (2010) afirmaron que la cáscara de huevo moreno tiene una gravedad específica, grosor de cáscara y resistencia a la rotura significativamente mayor en comparación con la cáscara de huevo blanco.

Los mismos autores también afirmaron que la edad de la gallina afecta significativamente a estas variables, viéndose las tres disminuidas significativamente a medida que esta aumenta.

Según un estudio realizado por Benavides-Reyes et al. (2021), la resistencia a la rotura de la cáscara disminuyó de 5,8 kg en huevos de gallinas de 33 semanas a 4,4 kg en gallinas de 67 semanas (una reducción del 25%). El grosor de la cáscara de huevo también disminuyó entre un 6 y un 10% con la edad. La disminución de la resistencia a la rotura pareció ser debida no solo al menor grosor de la cáscara sino también a las características microscópicas de la misma, la menor cohesión entre la cáscara y las membranas del huevo y por el mayor tamaño de los cristales de calcio con respecto a huevos de gallinas jóvenes, lo cual reduce la cohesión entre los mismos.

Park y Sohn (2018) mostraron que las gallinas de más edad, en el útero, poseen deformaciones histológicas, fibrosis, atrofia y menor número de microvellosidades endometriales que las gallinas más jóvenes. A su vez, afirmaron que la cantidad de calcio de la cáscara del huevo disminuye significativamente con el aumento de la edad de la gallina, mientras que los niveles de sodio aumentan. Sin embargo, la concentración de calcio y sodio en sangre no cambia con la edad. Por lo tanto, los daños en el tejido endometrial inhiben los procesos de transmisión de iones, se reduce la concentración de calcio en el útero, se aumenta la de sodio y la formación de la cáscara del huevo se ve dificultada.

Es por estas razones que un grosor, peso y densidad de cáscara menores y una resistencia a la rotura disminuidos (corrigiendo los datos acorde al tamaño del huevo) serían los resultados que cabría esperar en la granja comercial en caso de haber realizado el análisis de las cáscaras. En este experimento en la granja experimental no se esperan ni se observan problemas graves de calidad de cáscara puesto que son gallinas jóvenes.

Los resultados de las manchas de carne y sangre, reflejados en porcentaje en la tabla 4, muestran que la mayoría de los huevos no tenían ninguna mancha, al igual que ocurrió en la granja comercial. En este caso las gallinas tratadas pusieron menos huevos sin manchas de sangre y más huevos sin manchas de carne que las gallinas control. En el anterior experimento en la granja comercial las gallinas tratadas pusieron un mayor porcentaje de huevos sin manchas de ambos tipos.

Tabla 4. Porcentaje de huevos con manchas de sangre y carne en granja SEA.

		FEROMONAS	
		SÍ	NO
Manchas de sangre (%)	0	67,6	71,2
	1	30,5	27,1
	2	1,9	1,7
Manchas de carne (%)	0	74,6	71
	1	20,6	25,1
	2	4,9	3,9

Sin embargo, y al igual que ocurrió en el caso de la granja comercial, tras aplicar la prueba de Kruskal-Wallis para hallar la significación estadística se observa que la distribución de manchas de carne entre uso y no uso de feromona no varía, de tal modo que la feromona no tiene influencia sobre la presencia y tamaño de las manchas de carne con una significación del 0,251 y tampoco sobre las manchas de sangre con una significación del 0,263.

La edad es más influyente que las feromonas en la presencia de estas manchas, tal y como se demostró en el experimento de Granja San Miguel sobre las manchas de sangre y como demostraron Yenilmez y Atay (2023) en su estudio, en el que el número y tamaño de las manchas de carne en los huevos aumentaban según la edad de los animales. Estos son los resultados que cabría esperar en caso de comparar los presentes resultados con los obtenidos tras analizar los huevos de las mismas gallinas al final de su periodo productivo.

### 6.2.2. RITMOS CIRCADIANOS

Los resultados de los acelerómetros colocados en los animales se procesaron mediante el programa *Cosinor*. El mismo es una herramienta utilizada en el análisis de datos relacionados con ritmos fisiológicos, como el ritmo circadiano, donde se estudia la variación de una variable biológica (en este caso el movimiento) a lo largo de un ciclo de 24 horas. Estos ritmos siguen una forma sinusoidal a lo largo del tiempo.

Un ritmo circadiano es un ciclo biológico que se repite aproximadamente cada 24 horas y está sincronizado con el ciclo de luz y oscuridad del día. En las gallinas de puesta, al igual que

en otros animales, los ritmos circadianos desempeñan un papel crucial en la regulación del ciclo de sueño y vigilia, en la secreción de hormonas y en la producción de huevos (Zhang et al., 2016). De hecho, Geng et al. (2022) demostraron que el peso ovárico, el peso del oviducto, la longitud del oviducto y el número de folículos a las 30 semanas se vieron significativamente afectados dependiendo de un fotoperiodo continuo o intermitente, siendo todos los datos anteriores significativamente más altos en el grupo de animales con fotoperiodo continuo que en el grupo con fotoperiodo intermitente.

La exposición al fotoperiodo es capaz incluso de alterar significativamente la composición y función metabólica de la microbiota intestinal variando la cantidad de ácidos grasos de cadena corta y afectando a la salud final de la gallina (Zhang et al., 2023).

En el ensayo se determinaron tres parámetros rítmicos: el mesor, la amplitud y la acrofase. El mesor se refiere al valor promedio alrededor del cual oscila la onda del ritmo circadiano a lo largo de un ciclo de 24 horas, es decir, es el promedio aritmético del conjunto de datos de la onda formada por el ritmo circadiano, constituyendo un estimador de la tendencia central del nivel de actividad de los animales. La amplitud se refiere a la mitad del rango de oscilación de la onda  $([valor\ más\ alto - valor\ más\ bajo] / 2)$ , o lo que es lo mismo, la diferencia entre el pico (o el valle) y valor medio de una onda (el mesor). Por último, la acrofase es el momento del día en el cual se alcanza el valor máximo del ritmo circadiano (Refinetti, 2016).

Los resultados de las tres variables de cada grupo (con y sin feromonas) se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Valores medios de mesor, amplitud y acrofase ( $\pm$  desviación estándar) para los grupos con y sin feromonas.

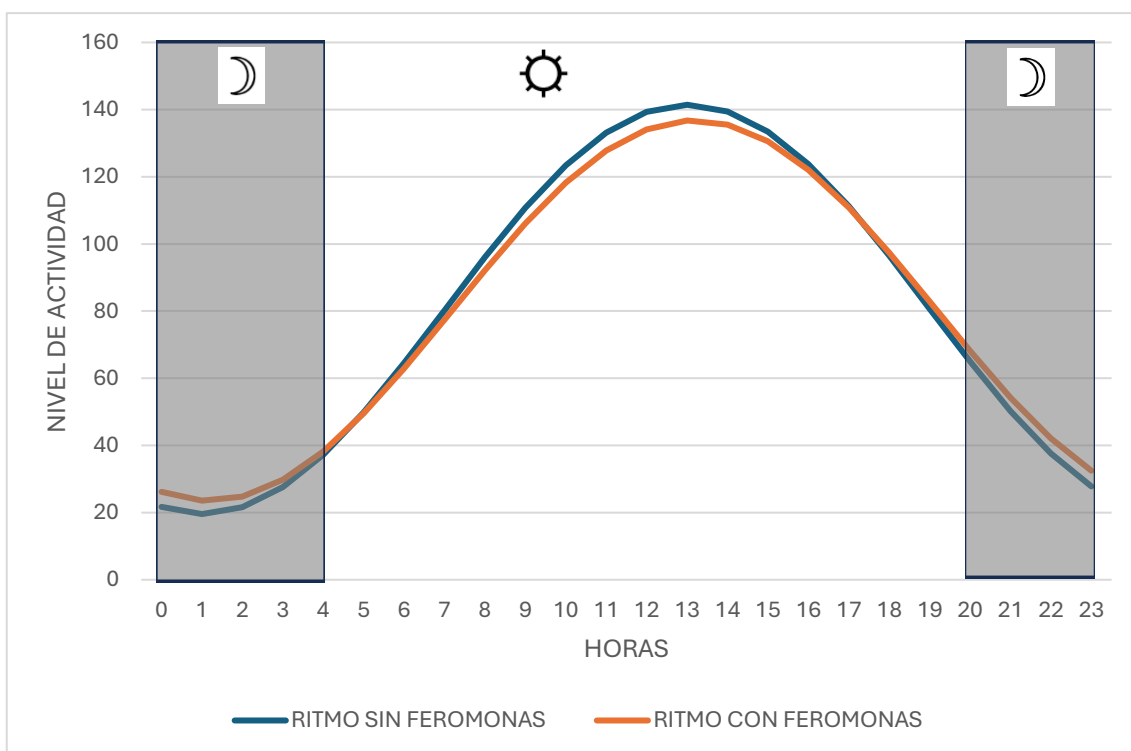
	SIN FEROMONAS	CON FEROMONAS	Significación
	Media	Media	
Mesor	75,40 $\pm$ 23,59	80,15 $\pm$ 17,49	0,662
Amplitud	56,62 $\pm$ 17,70	57,45 $\pm$ 12,47	0,917
Acrofase	12,85 $\pm$ 0,81	13,16 $\pm$ 0,67	0,424

Tras realizar un ANOVA no se observó diferencia significativa entre las variables cuantificables de los ritmos circadianos de ambos grupos de animales, obteniéndose valores de significación de mesor, amplitud y acrofase superiores a 0,05. Lo que sí se observó fue que el

coeficiente de variación para los tres valores de mesor, amplitud y acrofase fue menor en el caso de las gallinas tratadas con feromonas, lo que indica que las gallinas pueden tener tendencia a tener comportamientos parecidos unas a otras, habiendo menos dispersión en sus comportamientos. Este hecho puede corroborar los estudios realizados por Pageat (2005) y Madec et al. (2008a), quienes afirman que las feromonas son capaces de disminuir el estrés, la ansiedad y la agresividad, lo cual demostraron principalmente con la presencia de menor número de heridas en las canales, con la mayor tasa de crecimiento y con los menores niveles de corticosterona en sangre. Gracias a estos datos concluyeron que la difusión constante de feromonas podría mejorar el bienestar y el crecimiento de las aves al reducir el estrés. En el presente experimento en las instalaciones del SEA se observa que la repercusión de las feromonas en los niveles de actividad de los animales puede verse reflejado en la uniformidad de los comportamientos del grupo más que en la cuantificación de los mismos.

La figura 22 representa los datos de mesor, amplitud y acrofase de ambos grupos de animales. La actividad del animal comienza a aumentar a partir de las 4:00 horas, momento en el que comienza la suplementación lumínica, y disminuye a partir de las 20:00 horas, momento en el que se termina.

Figura 22. Comparativa de ritmos circadianos promedios de los grupos con y sin feromonas.



## 7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

### CONCLUSIONES

- El uso de feromonas puede repercutir positivamente en la calidad interna del huevo, aportando aproximadamente 0,73 unidades Haugh más al huevo.
- El uso de feromonas puede implicar una ligera reducción en el peso del huevo y el color de la yema, así como en el color, la firmeza, el peso, el grosor, la densidad y el porcentaje de cáscara.
- El tamaño de manchas de carne y sangre pueden aumentar con la edad del animal, incluso pueden variar ligeramente entre lotes de animales de la misma edad.
- La repercusión de las feromonas en los niveles de actividad de los animales puede verse reflejado en la mejora de la uniformidad de los comportamientos del grupo más que en la cuantificación de los mismos.
- Las características ambientales o individuales pueden haber interferido en los resultados obtenidos, por lo que es conveniente un estudio cruzado complementario en el que el grupo control pase a ser el grupo con feromonas y viceversa, de tal forma que si se observan diferencias estas sean determinantes.
- Igualmente es conveniente un experimento en el que se sometan a ambos grupos de gallinas a condiciones ambientales estresantes tales como inadecuada intensidad lumínica, temperatura o humedad relativa para observar así el comportamiento y los índices productivos de las gallinas en estas circunstancias.

### CONCLUSIONS

- The use of pheromones can positively impact the internal quality of the egg, providing approximately 0.73 Haugh units more per egg.
- The use of pheromones may result in a slight reduction in egg weight and yolk color, as well as in the color, firmness, weight, thickness, density, and percentage of the shell.
- The size of meat and blood spots can increase with the age of the animal, and they may even vary slightly between batches of animals of the same age.
- The impact of pheromones on the activity levels of animals may be reflected in the improvement of the uniformity of group behaviors rather than in the quantification of the behaviors themselves.
- Environmental or individual characteristics may have interfered with the obtained results, hence a complementary cross-study is advisable, where the control group

becomes the pheromone group and viceversa, so that any observed differences are conclusive.

- Similarly, an experiment subjecting both groups of hens to stressful environmental conditions such as inadequate light intensity, temperature, or relative humidity is advisable to observe the behavior and productivity indices of the hens under such circumstances.

## 8. VALORACIÓN PERSONAL

Realizar este proyecto sobre el uso de feromonas apaciguadoras en la avicultura de puesta ha sido una experiencia profundamente instructiva y gratificante para mí. La motivación para elegir este tema proviene de mi interés en las prácticas innovadoras dentro de la producción avícola y en la defensa del abastecimiento de suficientes alimentos inocuos, nutritivos y genuinos a la población. La posibilidad de que las feromonas apaciguadoras pudieran fomentar el bienestar en las gallinas y, a su vez, mejorar la calidad de los huevos, me pareció un área de estudio con un potencial significativo tanto a nivel científico como comercial.

Uno de los principales desafíos que enfrenté durante la realización de este TFG fue garantizar la precisión en la medición de todos los parámetros definitorios de la calidad de los huevos. Además, interpretar los datos en el contexto de variaciones ambientales y fisiológicas presentó dificultades adicionales. Sin embargo, estos retos me enseñaron a mirar más allá de los meros números obtenidos, a buscar explicaciones y a ser meticuloso en el análisis de datos.

A través de este proyecto, he adquirido un profundo conocimiento sobre la fisiología y el comportamiento de las aves de corral, así como sobre técnicas modernas de medición de niveles de actividad de los animales y de control de calidad de los huevos. Además, he adquirido habilidades en la redacción y presentación de resultados de manera clara y concisa.

Mi contribución personal al sector radica en proporcionar evidencia empírica sobre los efectos de las feromonas apaciguadoras en la avicultura de puesta, en especial en los sistemas libres de jaula. Los resultados obtenidos sugieren que el uso de estas feromonas puede tener un impacto positivo en la calidad de los huevos y en el comportamiento de las aves, lo cual podría influir en futuras prácticas avícolas y en la investigación sobre el bienestar animal.

Estoy extremadamente satisfecho con los resultados alcanzados y orgulloso de haber abordado un tema de gran relevancia para la industria avícola. La retroalimentación recibida por parte del personal del departamento ha sido muy positiva y ha confirmado la validez y la

importancia de mi trabajo. Aunque siempre hay margen para mejoras, considero que el trabajo realizado cumple con los objetivos propuestos y aporta un valor significativo al sector.

En cuanto al futuro, este TFG ha reafirmado mi interés en continuar explorando la producción avícola y el bienestar animal a través de mi carrera profesional. Las tecnologías y enfoques innovadores han transformado la industria avícola en las últimas décadas, y en el futuro estos seguirán mejorando tanto la producción como la calidad de vida de los animales.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Aerni, V., Brinkhof, M., Wechsler, B., Oester, H., & Fröhlich, E. (2005). Productivity and mortality of laying hens in aviaries: a systematic review. *World's Poultry Science Journal*, 61(1), 130-142. <https://doi.org/10.1079/wps200450>

Ahammed, M., Chae, B. J., Lohakare, J., Keohavong, B., Lee, M. H., Lee, S. J., Kim, D. M., Lee, J. Y., & Ohh, S. J. (2014). Comparison of Aviary, Barn and Conventional Cage Raising of Chickens on Laying Performance and Egg Quality. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(8), 1196-1203. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13394>

Benavides-Reyes, C., Folegatti, E., Domínguez-Gasca, N., Litta, G., Sánchez-Rodríguez, E., Rodríguez-Navarro, A. B., & Faruk, M. U. (2021). Research Note: Changes in eggshell quality and microstructure related to hen age during a production cycle. *Poultry Science*, 100(9), 101287. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101287>

Bist, R. B., Subedi, S., Yang, X., & Chai, L. (2023). Effective strategies for mitigating feather pecking and cannibalism in cage-free W-36 pullets. *Poultry*, 2(2), 281-291. <https://doi.org/10.3390/poultry2020021>

Chung, S. H., & Lee, K. (2014). Effect of hen age, storage duration and temperature on egg quality in laying hens. *International Journal of Poultry Science*, 13(11), 634-636. <https://doi.org/10.3923/ijps.2014.634.636>

Costa, L. S. M., Pereira, D. F., De Freitas Bueno, L. G., & Pandorfi, H. (2012). Some aspects of chicken behavior and welfare. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 14(3), 159-164. <https://doi.org/10.1590/s1516-635x2012000300001>

Du, X., Qin, P., Liu, Y., Amevor, F. K., Shu, G., Li, D., & Zhao, X. (2022). Effects of key farm management practices on pullets welfare - A Review. *Animals*, 12(6), 729. <https://doi.org/10.3390/ani12060729>

Eisen, E., Bohren, B., & McKean, H. (1962). The Haugh unit as a measure of egg albumen quality. *Poultry Science*, 41(5), 1461-1468. <https://doi.org/10.3382/ps.0411461>

Geng, A., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, H., Chu, Q., Zhang, Y., & Liu, H. (2022). Effects of light regime on circadian rhythmic behavior and reproductive parameters in native laying hens. *Poultry Science*, 101(5), 101808. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101808>

Guilmineau, F., Krause, I., & Kulozik, U. (2005). Efficient analysis of egg yolk proteins and their thermal sensitivity using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis under reducing and nonreducing conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9329-9336. <https://doi.org/10.1021/jf050475f>

Heerkens, J. L., Delezie, E., Kempen, I., Zoons, J., Ampe, B., Rodenburg, T. B., & Tuytens, F. A. (2015). Specific characteristics of the aviary housing system affect plumage condition, mortality and production in laying hens. *Poultry Science*, 94(9), 2008-2017. <https://doi.org/10.3382/ps/pev187>

Heerkens, J., Delezie, E., Rodenburg, T., Kempen, I., Zoons, J., Ampe, B., & Tuytens, F. (2016). Risk factors associated with keel bone and foot pad disorders in laying hens housed in aviary systems. *Poultry Science*, 95(3), 482-488. <https://doi.org/10.3382/ps/pev339>

Hughes, B., Gilbert, A. B., & Brown, M. F. (1986). Categorization and causes of abnormal egg shells: Relationship with stress. *British Poultry Science*, 27(2), 325-337. <https://doi.org/10.1080/00071668608416885>

Hunton, P. (2005). Research on eggshell structure and quality: an historical overview. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 7(2), 67-71. <https://doi.org/10.1590/s1516-635x2005000200001>

Iannotti, L., Lutter, C., Bunn, D., & Stewart, C. P. (2014). Eggs: the uncracked potential for improving maternal and young child nutrition among the world's poor. *Nutrition Reviews*, 72(6), 355-368. <https://doi.org/10.1111/nure.12107>

Innosa, D., Ianni, A., Palazzo, F., De Martino, F., Bennato, F., Grotta, L., & Martino, G. (2019). High temperature and heating effect on the oxidative stability of dietary cholesterol in different real food systems arising from eggs. *European Food Research and Technology*, 245(7), 1533-1538. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03266-4>

Jacob, J., Miles, R., & Mather, F. (2000). Egg quality. *Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS), University of Florida, PS 24.*

Kittelsen, K. E., Tahamtani, F., Moe, R. O., Gretarsson, P., & Vasdal, G. (2022). Flock Factors Correlated with Elevated Mortality in Non-Beak Trimmed Aviary-Housed Layers. *Animals*, 12(24), 3577. <https://doi.org/10.3390/ani12243577>

Kolattukudy, P. E., & Rogers, L. (1987). Biosynthesis of 3-hydroxy fatty acids, the pheromone components of female mallard ducks, by cell-free preparations from the uropygial gland. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 252(1), 121-129. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90015-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90015-4)

Lana, S. R. V., Lana, G. R. Q., De Lima Salvador, E., Lana, Â. M. Q., Cunha, F. S. A., & Marinho, A. L. (2017). Qualidade de ovos de poedeiras comerciais armazenados em diferentes temperaturas e períodos de estocagem. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 18(1), 140-151. <https://doi.org/10.1590/s1519-99402017000100013>

Lutter, C., & Morris, S. S. (2018). Eggs: a high potential food for improving maternal and child nutrition. *Maternal and Child Nutrition*, 14(S3), 1-2. <https://doi.org/10.1111/mcn.12666>

Madec, I., Gabarrou, J. F., Saffray, D., & Pageat, P. (2008a). Broilers (*Gallus gallus*) are less stressed if they can smell a mother odorant. *South African Journal of Animal Science*, 38(3), 201-206. <https://doi.org/10.4314/sajas.v38i3.4126>

Madec, I., Gabarrou, J. F., Guillaume, D., Lecuelle, C. L., Bougrat, L., & Pageat, P. (2008b). Are Thirty-Five Days enough to observe the Stress-Reducing effect of a semiochemical analogue on chickens (*Gallus gallus domesticus*) housed under high density? *Poultry Science*, 87(2), 222-225. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00006>

Marzec, A., Damaziak, K., Kowalska, H., Riedel, J., Michalczyk, M., Koczywąg, E., Cisneros, F., Lenart, A., & Niemiec, J. (2019). Effect of hens age and storage time on functional and physiochemical properties of eggs. *Journal Of Applied Poultry Research*, 28(2), 290-300. <https://doi.org/10.3382/japr/pfy069>

McGlone, J. J., & Anderson, D. L. (2002). Synthetic maternal pheromone stimulates feeding behavior and weight gain in weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 80(12), 3179-3183. <https://doi.org/10.2527/2002.80123179x>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas. Gobierno de España. (2023). *El sector de la avicultura de puesta en cifras: Principales indicadores económicos 2022*.

Moltz, H., & Lee, T. (1981). The maternal pheromone of the rat: Identity and functional significance. *Physiology & Behavior*, 26(2), 301-306. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90026-3)

Moreno-Rueda, G. (2017). Preen oil and bird fitness: a critical review of the evidence. *Biological Reviews*, 92(4), 2131-2143. <https://doi.org/10.1111/brv.12324>

Moyer, B.R., Rock, A.N. & Clayton, D.H. (2003). Experimental test of the importance of preen oil in rock doves (*Columba livia*). *The Auk*, 120(2), 490-496. [https://doi.org/10.1642/0004-8038\(2003\)120](https://doi.org/10.1642/0004-8038(2003)120)

Mumma, J. O., Thaxton, J. P., Vizzier-Thaxton, Y., & Dodson, W. L. (2006). Physiological Stress in Laying Hens. *Poultry Science*, 85(4), 761-769. <https://doi.org/10.1093/ps/85.4.761>

Nys, Y. (2000). Dietary carotenoids and egg yolk coloration - a review. *Archiv für Geflügelkunde*, 64(2), 45-54. <https://www.researchgate.net/publication/279647522>

Odabasi, A. Z., Miles, R. D., Balaban, M. Ö., & Portier, K. M. (2007). Changes in brown eggshell color as the hen ages. *Poultry Science*, 86(2), 356-363. <https://doi.org/10.1093/ps/86.2.356>

Pageat, P. (2001). "Pig appeasing pheromone to decrease stress, anxiety and aggressiveness". US6169113B1.

Pageat, P. (2005). "Feromonas tranquilizantes aviarias para disminuir el estrés, la ansiedad y la agresividad". ES2345099T3.

Pageat, P., & Gaultier, E. (2003). Current research in canine and feline pheromones. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33(2), 187-211. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(02)00128-6)

Park, J. A., & Sohn, S. H. (2018). The influence of hen aging on eggshell ultrastructure and shell mineral components. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(5), 1080-1091. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e41>

Peixoto, M. R. L. V., Cooley, L., & Widowski, T. M. (2021). Maternal age and maternal environment affect stress reactivity and measures of social behaviour in laying hens. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96323-6>

Post, J., Rebel, J. M., & Ter Huurne, A. (2003). Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the

physiological effects of stress. *Poultry Science*, 82(8), 1313-1318.  
<https://doi.org/10.1093/ps/82.8.1313>

Puvadolpirod, S., & Thaxton, J. P. (2000). Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. *Poultry Science*, 79(3), 363-369. <https://doi.org/10.1093/ps/79.3.363>

Rayan, G., Galal, A., Fathi, M. M., & El-Attar, A. H. (2010). Impact of layer breeder flock age and strain on mechanical and ultrastructural properties of eggshell in chicken. *International Journal of Poultry Science*, 9(2), 139-147. <https://doi.org/10.3923/ijps.2010.139.147>

Real Decreto 3/2002, de 11 de enero, por el que se establecen las normas mínimas de protección de las gallinas ponedoras. *Boletín Oficial del Estado*, 13, de 15 de enero de 2002. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2002/01/11/3/con>

Refinetti, R. (2016). *Circadian Physiology*. CRC Press.

Reglamento (CE) nº 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de noviembre de 2003 sobre el control de la salmonela y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos. <http://data.europa.eu/eli/reg/2003/2160/oj>

Reglamento (CE) nº 589/2008 de la Comisión, de 23 de junio de 2008, por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 1234/2007 del Consejo en lo que atañe a las normas de comercialización de los huevos. <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/589/oj>

Riddell, P., Paris, M., Joone, C., Pageat, P., & Paris, D. B. (2021). Appeasing pheromones for the management of stress and aggression during conservation of wild canids: Could the solution be right under our nose? *Animals*, 11(6), 1-23. <https://doi.org/10.3390/ani11061574>

Rodríguez-Navarro, A. B., Kálin, O., Nys, Y., & García-Ruiz, J. M. (2002). Influence of the microstructure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages. *British Poultry Science*, 43(3), 395-403. <https://doi.org/10.1080/00071660120103675>

Rufener, C., Berezowski, J., Sousa, F. M., Abreu, Y., Asher, L., & Toscano, M. J. (2018). Finding hens in a haystack: Consistency of movement patterns within and across individual laying hens maintained in large groups. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29962-x>

Samiullah, S., Roberts, J. R., & Chousalkar, K. K. (2015). Eggshell color in brown-egg laying hens - a review. *Poultry Science*, 94(10), 2566-2575. <https://doi.org/10.3382/ps/pev202>

Samli, H. E., Agma, A., & Senkoylu, N. (2005). effects of storage time and temperature on egg quality in old laying hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 14(3), 548-553. <https://doi.org/10.1093/japr/14.3.548>

Sandilands, V., Savory, J., & Powell, K. (2004). Preen gland function in layer fowls: factors affecting morphology and feather lipid levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137(1), 217-225. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2003.10.004>

Schuck-Paim, C., Negro-Calduch, E., & Alonso, W. J. (2021). Laying hen mortality in different indoor housing systems: a meta-analysis of data from commercial farms in 16 countries. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81868-3>

Shawkey, M. D., Pillai, S. R., & Hill, G. E. (2003). Chemical warfare? Effects of uropygial oil on feather-degrading bacteria. *Journal of Avian Biology*, 34(4), 345-349. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2003.03193.x>

Silversides, F. G., & Scott, T. A. (2001). Effect of storage and layer age on quality of eggs from two lines of hens. *Poultry Science*, 80(8), 1240-1245. <https://doi.org/10.1093/ps/80.8.1240>

Smith, D. P., & Musgrove, M. T. (2008). Effect of blood spots in table egg albumen on salmonella growth. *Poultry Science*, 87(8), 1659-1661. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00528>

Sokołowicz, Z., Krawczyk, J., & Dykiel, M. (2018). The effect of the type of alternative housing system, genotype and age of laying hens on egg quality. *Annals of Animal Science*, 18(2), 541-556. <https://doi.org/10.2478/aoas-2018-0004>

Stratmann, A., Mühlemann, S., Vögeli, S., & Ringgenberg, N. (2019). Frequency of falls in commercial aviary-housed laying hen flocks and the effects of dusk phase length. *Applied Animal Behaviour Science*, 216, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.04.008>

Tauson, R. (2002). Furnished cages and aviaries: production and health. *World's Poultry Science Journal*, 58(1), 49-63. <https://doi.org/10.1079/wps20020007>

Tirindelli, R., Dibattista, M., Pifferi, S., & Menini, A. (2009). From Pheromones to Behavior. *Physiological Reviews*, 89(3), 921-956. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2008>

Tumová, E., & Gous, R. M. (2012). Interaction of hen production type, age, and temperature on laying pattern and egg quality. *Poultry Science*, 91(5), 1269-1275. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01951>

United States Department of Agriculture - USDA (2000). *United States standards, grades, and weight classes for shell eggs* (AMS 56). Marketing and Regulatory Programs, Agricultural Marketing Service, Poultry Programs.

Van Sommeren, A., & Van Dierendonck, M. (2010). The use of equine appeasing pheromone to reduce ethological and physiological stress symptoms in horses. *Journal of Veterinary Behavior*, 5(4), 213-214. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2009.11.006>

Vilela, D. R., Carvalho, L. S. S., Fagundes, N. S., & De Abreu Fernandes, E. (2016). Internal and external quality of commercial laying hens eggs with normal and vitreous eggshell. *Ciência Animal Brasileira*, 17(4), 509-518. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i421535>

Villagrà, A., Lainez, M., Guillén, PL. & Torres A. (2003). Comparación de tres sistemas de producción de gallinas ponedoras (II): otros parámetros productivos. *ITEA - Información Técnica Económica Agraria*, 24(1), 220-222. [https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2003/comunicaciones/2003\\_CdP\\_71.pdf](https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2003/comunicaciones/2003_CdP_71.pdf)

Walker, A., & Hughes, B. (1998). Egg shell colour is affected by laying cage design. *British Poultry Science*, 39(5), 696-699. <https://doi.org/10.1080/00071669888593>

Wang, X., Liu, L., Zhao, J., Jiao, H., & Lin, H. (2017). Stress impairs the reproduction of laying hens: an involvement of energy. *Worlds Poultry Science Journal*, 73(4), 845-856. <https://doi.org/10.1017/s0043933917000794>

Wang, Y., Wang, Z., & Shan, Y. (2019). Assessment of the relationship between ovomucin and albumen quality of shell eggs during storage. *Poultry Science*, 98(1), 473-479. <https://doi.org/10.3382/ps/pey349>

World Organization for Animal Health - WOAH (2024, enero). Animal welfare: a vital asset for a more sustainable world. <https://www.woah.org/app/uploads/2024/01/en-woah-visionpaper-animalwelfare.pdf>

Yenilmez, F., & Atay, A. (2023). Changes in egg production, egg quality, blood and egg cholesterol levels with age in layer hen. *European Journal of Veterinary Medicine*, 3(2), 6-11. <https://doi.org/10.24018/ejvetmed.2023.3.2.73>

Zeltner, E., Klein, T., & Huber-Eicher, B. (2000). Is there social transmission of feather pecking in groups of laying hen chicks? *Animal Behaviour*, 60(2), 211-216. <https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1453>

Zhang, Y., Li, Y., Yuan, Y., Wang, J., Zhang, S., Zhu, R., Wang, Y., Wu, Y., Liao, X., & Mi, J. (2023). Reducing light exposure enhances the circadian rhythm of the biological clock through interactions with the gut microbiota. *Science of the Total Environment*, 858, 160041. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160041>

Zhang, Z., Wang, Y., Li, L., Yin, H., Li, D., Zhao, X., Liu, Y., & Zhu, Q. (2016). Circadian clock genes are rhythmically expressed in specific segments of the hen oviduct. *Poultry Science*, 95(7), 1653-1659. <https://doi.org/10.3382/ps/pew051>