

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 16/12/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANTIMICROBIAL PEPTIDES AS
ADDITIVES TO BEEF CATTLE NUTRITION**

Raiza Felismino Silveira
Animal Scientist, MSc.

2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANTIMICROBIAL PEPTIDES AS
ADDITIVES TO BEEF CATTLE NUTRITION**

Raiza Felismino Silveira

Advisor: Prof. Dr. Eduardo Festozo Vicente

Co-advisor: Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis

Thesis submitted to the School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal – Unesp as part of the requirements for obtaining the Doctor degree in Animal Science.

2021

S587a Silveira, Raiza
Antimicrobial peptides as additives to beef cattle
nutrition / Raiza Silveira. -- Jaboticabal, 2021
96 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Eduardo Vicente
Coorientador: Ricardo Reis

1. Antimicrobial peptides. 2. Animal Nutrition. 3.
Ruminants. 4. Feed additive. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).


Essa ficha não pode ser modificada.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: ANTIMICROBIAL PEPTIDES AS ADDITIVES TO BEEF CATTLE NUTRITION


AUTORA: RAÍZA FELISMINO SILVEIRA
ORIENTADOR: EDUARDO FESTOZO VICENTE
COORIENTADORA: AMÉLIA KATIANE DE ALMEIDA
COORIENTADOR: RICARDO ANDRADE REIS


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. EDUARDO FESTOZO VICENTE (Participação Virtual) 
Departamento Engenharia de Biosistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia - UNESP - Tupã

Pós-Doutorando MARCELO GINDRI (Participação Virtual) 
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE-INRAE / Paris/França

Profa. Dra. PRISCILLA AYLEEN BUSTOS MAC-LEAN (Participação Virtual) 
Curso de Engenharia de Biosistemas/FCE - UNESP / Tupã/SP

Dr. LUIS EDUARDO FERREIRA (Participação Virtual) 
PREMIX / Ribeirão Preto/SP

Pós-doutoranda VANESSA ZIRONDI LONGHINI (Participação Virtual) 
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 16 de dezembro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAIZA FELISMINO SILVEIRA – Filha de Francisco Carlos da Silveira e Edilene Felismino Silveira, nascida em Fortaleza, Ceará, em 28 de março de 1993. Em agosto de 2010, iniciou o Curso de Graduação em Zootecnia na Universidade Federal do Ceará - UFC onde obteve o título de bacharel em Zootecnia em dezembro de 2014. Em fevereiro de 2015, ingressou no Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp / FCAV), Jaboticabal - SP, sob orientação do Prof. Dr. Kleber Tomás de Resende e coorientação da Dra. Márcia Helena Machado da Rocha Fernandes finalizando o mesmo em julho de 2017. A partir da dissertação, o artigo *“Energy partition and nitrogen utilization by male goats fed encapsulated calcium nitrate as a replacement for soybean meal”* foi publicado na revista *Animal Feed Science and Technology*. Em agosto de 2017, iniciou seu doutorado e no ano seguinte deu início ao atual projeto sob orientação do Prof. Dr. Eduardo Festozo Vicente e coorientação do prof. Dr. Ricardo Andrade Reis. Ao longo do doutorado, publicou o artigo intitulado *“Energy expenditure of Saanen and Anglo-Nubian goats at different temperatures”* na revista *Small Ruminant Research*; *“Fast Determination of Short-Chain Fatty Acids and Glucose Simultaneously by Ultraviolet/Visible and Refraction Index Detectors via High-Performance Liquid Chromatography”* na revista *Food Analytical Methods*; o artigo de revisão *“Antimicrobial peptides as a feed additive alternative to animal production, food safety and public health implications: an overview”* na revista *Animal Nutrition*; o artigo *“Comparative activity of total polyphenols and antioxidant compounds from Uncaria tomentosa enhanced with citric acid”* na Revista Brasileira de Engenharia e o capítulo intitulado *“Peptídeos antimicrobianos na produção animal: uma alternativa biosustentável”* no livro *“Tecnologias Sustentáveis e Agronegócio”*.

“I learned that courage was not the absence of fear, but the triumph over it. The brave man is not who does not feel afraid, but who conquers that fear.”

Nelson Mandela, *Long Walk to Freedom*

DEDICATÓRIA

À minha família, que sempre apoiou minhas escolhas e decisões.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A mim. Por ter resistido, persistido e buscado forças onde achei que não mais havia para concluir essa etapa da minha vida acadêmica.

A Deus por me conceder vida e saúde para vencer todos os obstáculos que apareceram ao longo da jornada.

Aos meus pais Edilene e Carlos, ao meu irmão Osmar e aos meus sobrinhos Juan e Mirian. São minha família, minha base, minha referência de bondade, caráter e amor. Muito obrigada por terem abraçado esse sonho junto comigo e por entenderem minha ausência. Obrigada por me ouvirem nos momentos difíceis e por estarem sempre ao meu lado mesmo com toda a distância. Essa conquista é nossa. “A vida de quem inventa de voar é paradoxal, todo dia. É o peito eternamente dividido. É chorar porque queria estar lá, sem deixar de querer estar aqui. É ver o céu e o inferno na partida, o pesadelo e o sonho na permanência. É se orgulhar da escolha que te ofereceu mil tesouros e se odiar pela mesma escolha que te subtraiu outras mil pedras preciosas.”

Ao meu orientador, Eduardo, um ser humano excepcional com o qual pude conviver e trabalhar. Muitas pessoas na pós-graduação não tem a mesma sorte que eu. Meu orientador não foi apenas um professor, foi um amigo, que me ouviu, apoiou nos momentos difíceis, dividiu frustrações e alegrias comigo. Espero que muitos outros pós-graduandos tenham a sorte que eu tive.

À minha querida amiga Marina com a qual tive a honra de dividir casa desde o período do mestrado. Uma pessoa ímpar, de coração bondoso que sempre esteve pronta para ajudar. Me faltam palavras para expressar meus sentimentos, mas sei que cada um deles já é conhecido.

À minha amiga Stefany, com quem também dividi casa e experiências. Obrigada pelas conversas, conselhos e por estar sempre por perto. É difícil descrever como nossa amizade foi e é importante para mim.

À minha amiga Kétuly, que também dividiu casa comigo. Um dos motivos por eu agradecer todos os dias a Deus por cada pessoa que Ele coloca na minha vida. Espero

que nossa amizade cresça e prevaleça mesmo com a distância e as adversidades da vida.

À minha prima do coração, Tafnes, que já está comigo há mais de 10 anos, compartilhando as alegrias e tristezas que a vida acadêmica traz. Faz tempo que não nos vemos, mas nossa amizade nunca será resumida apenas a presença física.

Ao meu companheiro, Guilherme, que eu nem ousaria chamar apenas de “namorado” pois é um título muito superficial para o tanto que representa. É meu ponto de paz no meio do caos. O abraço que acalma e que conforta. Meu incentivador e com quem eu tenho tido o prazer e a alegria de dividir a vida. Nem consigo expressar tamanha gratidão por ter recebido esse presente. Obrigada por ser você, por estar sempre presente e por acreditar em mim – algumas vezes mais do que eu mesma.

Aos meus amigos da graduação, Gleyson, Theyson, Érica, Tafnes, Wallison e Rafael, minhas “mundiças”, que sempre estão prontos para animar qualquer pessoa no mundo. Obrigada pelas risadas e desesperos compartilhados. Espero vê-los muito em breve.

Aos meus gatinhos que trouxeram tantas alegrias aos meus dias. Adotei o Tony no meio do meu experimento e sempre ansiava por voltar para casa e encontrá-lo. Tonymho me salvou de mim por tantas vezes e foi meu companheiro nos longos dias e noites de pandemia e escrita de artigos. O Aron veio de presente para mim e foi um dos melhores que eu já ganhei. É sempre doce, ronronante e muito companheiro. Os dois são opostos e me fazem muito feliz.

Às minhas psicólogas, Andréa, Priscila e Analice, que ajudaram a me entender um pouco mais e em momentos tão difíceis me ouviram, me ajudaram e me guiaram por um caminho com menos sofrimento e dor. Um agradecimento especial à Analice, que me acompanhou na reta final do doutorado, nunca diminuiu minhas frustrações, sentimentos e me ajudou a passar pelas crises e sair de cabeça erguida delas. Que nos momentos eu que eu estava tão cansada e me sentindo incapaz, me ajudou a perceber que eu conseguiria terminar meu projeto. A pós-graduação é um período turbulento e ter ajuda profissional para passar por essa fase é de fundamental importância.

Ao Marcelo que me aturou com tantas idas e vindas da estatística, que me auxiliou no entendimento da minha tonelada de dados e que me inspirou em tantos momentos durante esse processo.

À Jéssica do Laboratório de Equipamentos Multiusuários do campus de Tupã, que me auxiliou na síntese e análises no HPLC.

À Premix que me cedeu espaço físico e abrigo no decorrer do experimento. Um agradecimento especial ao Luis, André e Laureston pelas experiências, dicas e sugestões divididas.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Unesp Jaboticabal e Tupã, ao grupo de pesquisa PeSEAp e CAPES por me permitirem e auxiliarem na realização desse sonho. A todos que de forma direta ou indireta tornaram possível que eu concluísse essa etapa.

Muito obrigada.

Sumário

RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
Tables Content.....	xvi
CHAPTER 1 – Antimicrobial peptides as a feed additive alternative to animal production, food safety and public health implications: An overview	17
1 Introduction.....	19
2 Antimicrobial resistance (AMR)	20
3 Antimicrobial peptides (AMP)	23
3.1 AMP activity	25
4 AMP utilization in animal feed	30
4.1 Swine	30
4.2 Cattle	33
4.3 Broiler and Layers.....	34
5 Food preservatives	38
6 Cattle disease treatments with AMPs.....	40
7 Public health implications and future implications	42
8 Conclusions.....	43
Acknowledgements	44
9 References	45
CHAPTER 2 - Use of antimicrobial peptide Ctx(Ile ²¹)-Ha and its analogue <i>ent</i> -Ctx(Ile ²¹)-Ha for an alternative feed additive in beef cattle*	61
Introduction.....	61
Materials and methods	63
Solid phase peptide synthesis	63
In vitro gas production, methane production and ruminal fermentation	64
Dry matter disappearance (DMD)	67
Neutral detergent fiber disappearance (NDFD)	67
End products of fermentation.....	68
Statistical Analysis	68
Results	70
Solid phase peptide synthesis	70
pH.....	72
Gas production	73
Methane emission.....	74
Dry matter disappearance.....	76
Neutral detergent fiber disappearance.....	77

Short chain fatty acids profile.....	78
Discussion.....	81
Conclusion.....	83
References.....	84
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	89
Fast Determination of Short-Chain Fatty Acids and Glucose Simultaneously by Ultraviolet/Visible and Refraction Index Detectors via High-Performance Liquid Chromatography.....	89



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Utilização de peptídeo antimicrobiano D-Ctx(Ile²¹)-Ha e suas formulações como aditivo na nutrição de bovinos de corte**", protocolo nº 8418/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Eduardo Festozo Vicente, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 16 de fevereiro de 2022.

Vigência do Projeto	30/07/2019 a 30/07/2020
Espécie / Linhagem	Bovino
Nº de animais	2
Peso / Idade	400kg, 4 anos
Sexo	Macho
Origem	Fazenda Experimental FCAV

Jaboticabal, 20 de fevereiro de 2022.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Peptídeos antimicrobianos como aditivos na nutrição de bovinos de corte

RESUMO

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs), identificados nos últimos anos a partir de várias espécies de animais vertebrados e invertebrados, vem recebendo atenção como um possível substituto aos aditivos alimentares atualmente utilizados para animais. Uma dessas moléculas, extraída a partir de uma rã do cerrado brasileiro, mostrou-se uma molécula antibiótica promissora devido sua atividade biológica contra fungos e bactérias. O peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha e seu isômero *ent*-Ctx(Ile²¹)-Ha mostraram-se capazes de permeabilizar e destruir membranas bacterianas e por isso têm se tornado foco de estudos para a nutrição de bovinos de corte objetivando a redução das bactérias Gram-positivas, já que seu modo de ação inespecífico (tem como alvo a membranas das células) dificultam o processo de resistência bacteriana. Objetivando avaliar os efeitos da aplicação do Ctx(Ile²¹)-Ha e seu isômero *ent*-Ctx(Ile²¹)-Ha para bovinos de corte mantidos sob sistema de pastejo em comparação com os aditivos convencionais utilizados na alimentação animal, foram conduzidos quatro estudos *in vitro* com diferentes substratos combinados com os aditivos monensina e virginiamicina e doses dos peptídeos antimicrobianos. Foram avaliados pH, produção de gases, produção de metano, perfil de ácidos graxos de cadeia curta e taxa de desaparecimento de matéria seca e fibra em detergente neutro. Os PAMs reduziram a produção de gases. A produção de metano, de forma geral, foi afetada de forma significativa pela interação entre substrato e aditivo. Além disso, a taxa de desaparecimento não foi afetada de forma significativa pelo uso dos PAMs. A produção de ácidos graxos de cadeia curta apresentou diferenças significativas, com o perfil de ácidos nos tratamentos com os PAMs semelhante àqueles com monensina. Os níveis intermediários do PAM *ent*-Ctx(Ile²¹)-Ha mostraram uma redução na emissão de gases e metano, sem comprometimento da utilização de matéria seca e fibra em detergente neutro, mostrando que a redução dos gases não se deu devido à redução na utilização de nutrientes pelos microrganismos. Estudos complementares devem ser conduzidos para melhor entendimento do modo de ação e dos efeitos da adição dos PAMs à dieta de ruminantes.

PALAVRAS-CHAVE: Aditivos; Antibióticos; Monensina; Peptídeos antimicrobianos; Resistência bacteriana; Virginiamicina.

Antimicrobial peptides as additives to beef cattle nutrition

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs), identified in recent years from several species of vertebrate and invertebrate animals, have been receiving attention as a possible substitute for feed additives currently used for animals. One of these molecules, extracted from a frog from the Brazilian Cerrado, proved to be a promising antibiotic molecule due to its biological activity against fungi and bacteria. The Ctx(Ile²¹)-Ha peptide and its *ent*-Ctx(Ile²¹)-Ha isomer proved to be capable of permeabilizing and destroying bacterial membranes and, therefore, have become the focus of studies for the nutrition of beef cattle aiming at reducing of Gram-positive bacteria, since their unspecific mode of action (targets cell membranes) hinder the process of bacterial resistance. Aiming to evaluate the effects of the application of Ctx(Ile²¹)-Ha and its *ent*-Ctx(Ile²¹)-Ha isomer for beef cattle kept under grazing system in comparison with conventional additives used in animal feed, four *in vitro* studies were conducted with different substrates combined with monensin and virginiamycin additives and doses of antimicrobial peptides. pH, gas production, methane production, short-chain fatty acid profile and rate of dry matter and neutral detergent fiber disappearance were evaluated. AMPs reduced gas production. Methane production, in general, was significantly affected by the interaction between substrate and additive. Furthermore, the disappearance rate was not significantly affected by the use of AMPs. The production of short-chain fatty acids showed significant differences, with the acid profile in treatments with AMPs similar to those with monensin. Intermediate levels of AMP *ent*-Ctx(Ile²¹)-Ha showed a reduction in the emission of gases and methane, without compromising the use of dry matter and neutral detergent fiber, showing that the reduction of gases was not due to the reduction in use of nutrients by microorganisms. Complementary studies should be conducted to better understand the mode of action and effects of adding AMPs to ruminants' diet.

KEYWORDS: Additives; Antibiotics; Antimicrobial peptides; Antimicrobial resistance; Monensin; Virginiamycin.

ABSTRACT: In the last few years, feed additives have been used in animal nutrition to improve nutrient utilization, health parameters and animal performance. However, the use of antibiotics as feed additives has allowed the occurrence of antimicrobial resistance (AMR), which can bring as a consequence, an increase in the morbidity and mortality of diseases that were previously treatable with antibiotics. In this context, antimicrobial peptides (AMP) have appeared as a promising strategy because they have multiple biological activities and represent a powerful strategy to prevent the development of resistant microorganisms. Despite the small number of studies applied in vivo, AMP appear as a potent alternative to the use of antibiotics in animal nutrition, due to an increase in feed efficiency and the prevention/treatment of some animal diseases. This review discusses the problems associated with antimicrobial resistance and the use of AMP as a strong candidate to replace conventional antibiotics, mainly in the animal industry.

Keywords: Additive; Antimicrobial peptide; Broiler; Cattle; Laying hen; Nutrition; Pig.

1 Introduction

According to the Food Outlook 2020, disclosed by The Food and Agricultural Organization (FAO, 2020), world meat demand increased 119 million metric tons. However, a reduction in pig meat production is anticipated due to the impact of African swine fever disease. In contrast, the same report shows an expansion of poultry and ovine meat production due to the increased demand. In the dairy sector, milk production is expected to experience an improvement of 1.4%, producing 860 million metric tons of milk per year.

Brazilian companies lead the world beef market, which moves more than 7 million metric tons per year between exports and imports. Since 2005, this country has internationalized the sector, purchasing large processing plants abroad. In 2018, Brazil became the major exporter, trading more than 2 million metric tons of meat, and was followed by Australia, which exported approximately 1.5 million metric tons (ABIEC, 2019). Therefore, countries need to improve the feed safety, health and process certification and quality of origin (traceability) aspects of the herd to avoid the possible serious risk of losing the positive results already achieved in international markets (Morgan et al., 2016; Conchon and Lopes, 2012).

The production of poultry meat in the world is led by the USA, China, and Brazil, which is responsible for a high economic value (FAO, 2020). In recent years, consumers have changed their perspectives when purchasing food products, focusing mainly on food safety (Heneghan, 2015). This factor is related to nutritionally

adequate usage and safe foods (Coleman-Jensen et al., 2020), with safe foods being those that do not affect consumer health (Chassy, 2010).

Various techniques have been employed in animal production to maximize food production. To achieve this, research needed to change from being solely focused on animal nutrition, replacing food nutritional value studies with an understanding of animal physiological processes and the factors that affect them (Wallace, 1994). In recent years, research has sought to manipulate and improve fermentative patterns and ruminal metabolism with additives in the diet (Meyer et al., 2009; Moya et al., 2009; Possenti et al., 2008), aiming to improve animal feed efficiency.

However, institutes such as the World Health Organization (WHO) and FAO have demonstrated concerns about the use of antibiotic additives in some situations, among them animal nutrition. Because of that, this research has been undertaken with the aim of finding some replacements for the usual additives.

Conclusion

Besides the large number of studies about antimicrobial peptides, the studies with AMP applied on ruminant nutrition are very scarce. However, in this study, the intermediary level of the AMP *ent*-Ctx(Ile²¹)-Ha reduced the gas production *in vitro* and methane emission without negative effect on the nutrient utilization. Although it must be performed more trials to gather more information about these natural

antibiotic molecules, the antimicrobial peptide *ent*-Ctx(Ile²¹)-Ha demonstrated to be a promising candidate to replace the conventional and synthetic additives that have been using in animal nutrition, mainly in beef cattle.

References

- Abbas, R.Z., Iqbal, Z., Sindhu, Z.D., Khan, M.N., Arshad, M., 2008. Identification of cross-resistance and multiple resistance in *Eimeria tenella* field isolates to commonly used anticoccidials in Pakistan. *J. Appl. Poult. Res.* 17, 361–368. <https://doi.org/10.3382/japr.2008-00027>
- Benchaar, C., 2015. Diet supplementation with cinnamon oil, cinnamaldehyde, or monensin does not reduce enteric methane production of dairy cows. *Animal* 10, 418–425. <https://doi.org/10.1017/S175173111500230X>
- Blümmel, M., Cone, J.W., Van Gelder, A.H., Nshalai, I., Umunna, N.N., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2005. Prediction of forage intake using in vitro gas production methods: Comparison of multiphase fermentation kinetics measured in an automated gas test, and combined gas volume and substrate degradability measurements in a manual syringe system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124 Pa, 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.040>
- Chiesa, L.M., DeCastelli, L., Nobile, M., Martucci, F., Mosconi, G., Fontana, M., Castrica, M., Arioli, F., Panseri, S., 2020. Analysis of antibiotic residues in raw bovine milk and their impact toward food safety and on milk starter cultures in cheese-making process. *Lwt* 131, 109783.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109783>

Daquiado, A.R., Cho, K.M., Kim, T.Y., Kim, S.C., Chang, H.H., Lee, Y.B., 2014. Methanogenic archaea diversity in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) rumen fluid, rectal dung, and barn floor manure using a culture-independent method based on *mcrA* gene sequences. *Anaerobe* 27, 77–81.

<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.01.008>

Detmann, E., 2013. Métodos para análises de alimentos - INCT - Ciência Animal. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1689–1699.

Ferreira Cespedes, G., Nicolas Lorenzon, E., Festozo Vicente, E., Jose Soares Mendes-Giannini, M., Fontes, W., de Souza Castro, M., Maffud Cilli, E., 2012. Mechanism of Action and Relationship Between Structure and Biological Activity of Ctx-Ha: A New Ceratotoxin-like Peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Protein Pept. Lett.* 19, 596–603. <https://doi.org/10.2174/092986612800494011>

Fox, John & Weisberg, S., 2011. *An R Companion to Applied Regression*.

Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A., Lantinga, E.A., 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 77–89. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01012-7](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01012-7)

Lagrange, S., Lobón, S., Villalba, J.J., 2019. Gas production kinetics and in vitro degradability of tannin-containing legumes, alfalfa and their mixtures. *Anim. Feed Sci. Technol.* 253, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.05.008>

Lee, S.S., Hsu, J.T., Mantovani, H.C., Russell, J.B., 2002. The effect of bovicin HC5,

- a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production in vitro¹. *FEMS Microbiol. Lett.* 217, 51–55. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01044-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01044-3)
- Lenth, R., 2019. Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.
- Leopoldino, W.M., Lana, R.P., Eifert, E.C., Arcuri, P.B., Mantovani, H.C., Martins, R.G.R., 2007. Avaliação de ionóforos pela técnica da perda do potássio celular e produção de gases in vitro. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 59, 1516–1522. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000600026>
- Liu, Q., Yao, S., Chen, Y., Gao, S., Yang, Y., Deng, J., Ren, Z., Shen, L., Cui, H., Hu, Y., Ma, X., Yu, S., 2017. Use of antimicrobial peptides as a feed additive for juvenile goats. *Sci. Rep.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12394-4>
- Magana, M., Pushpanathan, M., Santos, A.L., Leanse, L., Fernandez, M., Ioannidis, A., Giulianotti, M.A., Apidianakis, Y., Bradfute, S., Ferguson, A.L., Cherkasov, A., Seleem, M.N., Pinilla, C., de la Fuente-Nunez, C., Lazaridis, T., Dai, T., Houghten, R.A., Hancock, R.E.W., Tegos, G.P., 2020. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *Lancet Infect. Dis.* 20, e216–e230. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30327-3)
- Maria-Neto, S., De Almeida, K.C., Macedo, M.L.R., Franco, O.L., 2015. Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848, 3078–3088. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.02.017>
- Marten, G. C.; Barnes, R.F., 1979. Prediction of energy digestibility of forages with in

- vitro rumen fermentation and fungal enzymes systems., in: W.J. Pigden, C.C. Balch, M., Graham (Eds.), *Standardization of Analytical Methodology for Feeds*. International Development Research Center, Ottawa, pp. 61–128.
- Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa, K.S., Theodorou, M.K., 1999. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79, 321–330. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00033-4)
- Melchior, E.A., Hales, K.E., Lindholm-Perry, A.K., Freetly, H.C., Wells, J.E., Hemphill, C.N., Wickersham, T.A., Sawyer, J.E., Myer, P.R., 2018. The effects of feeding monensin on rumen microbial communities and methanogenesis in bred heifers fed in a drylot. *Livest. Sci.* 212, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.03.019>
- Menkem, Z.E., Ngangom, B.L., Tamunjoh, S.S.A., Boyom, F.F., 2019. Antibiotic residues in food animals: Public health concern. *Acta Ecol. Sin.* 39, 411–415. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.10.004>
- Odongo, N.E., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Or-Rashid, M.M., Hook, S.E., Gray, J.T., Kebreab, E., France, J., McBride, B.W., 2007. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 1781–1788. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-708>
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R.C.T., 2020. *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*.
- R Core Team, 2020. *R: A language and environment for statistical computing*. R

Foundation for Statistical Computing.

- Ren, Z., Yao, R., Liu, Q., Deng, Y., Shen, L., Deng, H., Zuo, Z., Wang, Y., Deng, J., Cui, H., Hu, Y., Ma, X., Fang, J., 2019. Effects of antibacterial peptides on rumen fermentation function and rumen microorganisms in goats. *PLoS One* 14, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221815>
- Schofield, P., Pitt, R.E., Pell, A.N., 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *J. Anim. Sci.* 72, 2980–2991. <https://doi.org/10.2527/1994.72112980x>
- Serafim, J.A., Silveira, R.F., Vicente, E.F., 2021. Fast Determination of Short-Chain Fatty Acids and Glucose Simultaneously by Ultraviolet/Visible and Refraction Index Detectors via High-Performance Liquid Chromatography. *Food Anal. Methods*. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-01990-w>
- Vicente, E.F., Basso, L.G.M., Cespedes, G.F., Lorenzón, E.N., Castro, M.S., Mendes-Giannini, M.J.S., Costa-Filho, A.J., Cilli, E.M., 2013. Dynamics and Conformational Studies of TOAC Spin Labeled Analogues of Ctx(Ile21)-Ha Peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060818>