



LUCAS CARNEIRO DE RESENDE

**EFFECT OF RUMEN NEUTRALIZERS ON PERFORMANCE, DIGESTIBILITY,
CHEWING BEHAVIOR, AND RUMEN FERMENTATION OF DAIRY COWS**

**LAVRAS – MG
2022**

LUCAS CARNEIRO DE RESENDE

**EFFECT OF RUMEN NEUTRALIZERS ON PERFORMANCE, DIGESTIBILITY,
CHEWING BEHAVIOR, AND RUMEN FERMENTATION OF DAIRY COWS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e nutrição de ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Marcos Neves Pereira
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Resende, Lucas Carneiro de.

Effect of Rumen Neutralizers on Performance, Digestibility,
Chewing Behavior, and Rumen Fermentation of Dairy Cows /
Lucas Carneiro de Resende. - 2022.

116 p.

Orientador(a): Marcos Neves Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.
Bibliografia.

1. Acidosis. 2. Rumen Neutralizers. 3. Rumen pH. I. Pereira,
Marcos Neves. II. Título.

LUCAS CARNEIRO DE RESENDE

**EFFECT OF RUMEN NEUTRALIZERS ON PERFORMANCE, DIGESTIBILITY,
CHEWING BEHAVIOR, AND RUMEN FERMENTATION OF DAIRY COWS**

**EFEITO DOS NEUTRALIZANTES RUMINAIS SOBRE O DESEMPENHO,
DIGESTIBILIDADE, COMPORTAMENTO MASTIGATÓRIO, E FERMENTAÇÃO
RUMINAL DE VACAS LEITEIRAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e nutrição de ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADO em 19 de agosto de 2022.

Prof. Dr. Mateus Pies Gionbelli
Prof. Dra. Marina de Arruda Camargo Danés
Prof. Dra. Carla Luiza da Silva Ávila
Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira

UFLA
UFLA
UFLA
EPAMIG

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

AGRADECIMENTOS

À DEUS pelos desafios que me foram confiados.

Aos meus pais José e Eliane, por me apoiarem nas escolhas que fiz, não somente durante essa etapa, mas também, ao longo de toda a minha vida. Obrigado por me criarem tão bem.

Ao meu irmão e melhor amigo, que apesar da distância sei que torceu por mim durante essa etapa. Obrigado por ser um alicerce tão importante na minha vida.

A minha Noiva e companheira Milena, por estar comigo todos os dias. Tenha certeza que sua presença e ajuda, mesmo que nos mínimos detalhes, fazem a caminhada diária ser mais fácil.

Ao meu orientador, Marcos Neves Pereira, pelos ensinamentos desde 2012.

Ao programa de pós-graduação em Zootecnia, técnicos e professores, com quem tive a oportunidade de conviver e aprender.

Aos amigos e colegas que fiz durante minha jornada acadêmica, especialmente à toda equipe do Grupo do Leite, sem vocês o presente trabalho não seria possível.

Aos técnicos laboratoriais que sempre se dispuseram a ajudar. Em especial ao Márcio, Stefânia e Flávio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Obrigado!!!

RESUMO GERAL

Aditivos alimentares neutralizantes do pH podem melhorar o desempenho de vacas leiteiras através de mecanismos relacionados ao controle de acidose ruminal e sistêmica e maior digestibilidade de nutrientes. Uma fonte de MgO calcinado foi desenvolvido para ter alta e persistente ação sobre o pH ruminal (pHix-Up, PHP). Este experimento avaliou o efeito da adição de bicarbonato de sódio (BIC. 1% da MS) ou PHP (0,5% da MS) a uma dieta basal (CTL) sobre o consumo de matéria seca, desempenho leiteiro, perfil de ácidos graxos do leite, digestibilidade de nutrientes, perfil fermentativo no rúmen, pH ruminal e fecal, comportamento ingestivo e balanço ácido-básico venoso. Quinze vacas Holandesas (29,5 kg/d de leite e 193 ± 120 dias em lactação) formaram 5 quadrados latinos 3 × 3 e receberam uma sequência dos 3 tratamentos em períodos de 21 dias e 13 dias de adaptação aos tratamentos. Durante os 17 primeiros dias de cada período as vacas foram alimentadas com uma dieta com 22,6% de amido na matéria seca. No dia 17, o alimento foi removido às 2200 h e uma dieta com 31,6% de amido na matéria seca foi fornecida à vontade do dia 18 ao 21 e mensurações foram obtidas ao longo do tempo. Os contrastes avaliados foram: CTL vs PHP e BIC vs PHP. Antes da indução de acidose o consumo de matéria seca (22,6 kg/d) e a produção de leite (27,5 kg/d) não diferiram. O PHP tendeu a aumentar o teor de gordura no leite (3,81%) em comparação ao CTL (3,63%) e BIC (3,65%). O PHP tendeu a aumentar o teor na gordura do leite de ácidos graxos monoinsaturados, insaturados, esteárico e oleico e aumentou a secreção diária de monoinsaturados, insaturados e oleico. Houve tendência de aumento na digestibilidade do extrato etéreo no trato digestivo total no PHP em comparação ao CTL (92,8 vs 91,5% do consumo). Durante a indução de acidose o consumo de matéria seca (22,9 kg/d) e a produção de leite (26,3 kg/d) também não diferiram. O BIC tendeu a aumentar os teores no leite de proteína (3,36 vs 3,30%) e de caseína (2,63 vs 2,58%) e aumentou a síntese de proteína microbiana no rúmen mensurada pela excreção diária de alantoína na urina. O pH, HCO₃⁻ e o excesso de base sanguíneo foram menores durante a indução de acidose. O PHP aumentou a pressão parcial de CO₂ e tendeu a aumentar a concentração de íons bicarbonato e CO₂ total no sangue em comparação ao CTL. A relação entre acetato e propionato no fluido do rúmen foi 3,8 antes da acidose e 2,7 durante a acidose e não foi afetada pelos tratamentos. O pH fecal foi menor durante acidose e foi maior para o PHP antes e durante acidose. Durante a acidose, o PHP tendeu a aumentar o pH ruminal médio (6,29 vs 6,24), tendeu a diminuir a duração de pH ≤ 6,2 (555 vs 653 min/d) e aumentou o pH ruminal mínimo (5,84 vs 5,72) em comparação a BIC. O PHP também tendeu a aumentar o pH mínimo em comparação ao CTL (5,75). A concentração sérica de Mg foi maior para o PHP e o BIC tendeu a aumentar o Na sérico em comparação ao PHP. Vacas alimentadas com PHP antes da acidose tenderam a ter menor tempo de refeições (394 vs 408 min/d) e de ruminação (460 vs 489 min/d e 73 vs 78 min/pH ruminal) que CTL. Durante a acidose, o PHP tendeu a reduzir o tempo de ingestão (336 vs 353 min/d) e de ruminação (19,4 vs 20,4 min/kg MS) em comparação ao CTL. A suplementação de PHP para vacas em final de lactação alimentadas com menor teor de amido tendeu a aumentar o teor de gordura e a secreção de ácidos graxos insaturados pré-formados no leite, a digestibilidade do extrato etéreo e o pH ruminal mínimo. Os aditivos neutralizantes aumentaram a capacidade tamponante do sangue durante acidose e PHP induziu pH ruminal mais alto que BIC.

Palavras-chave: Acidose. Bicarbonato de sódio. Digestibilidade. Óxido de magnésio. pH ruminal. Gordura do leite.

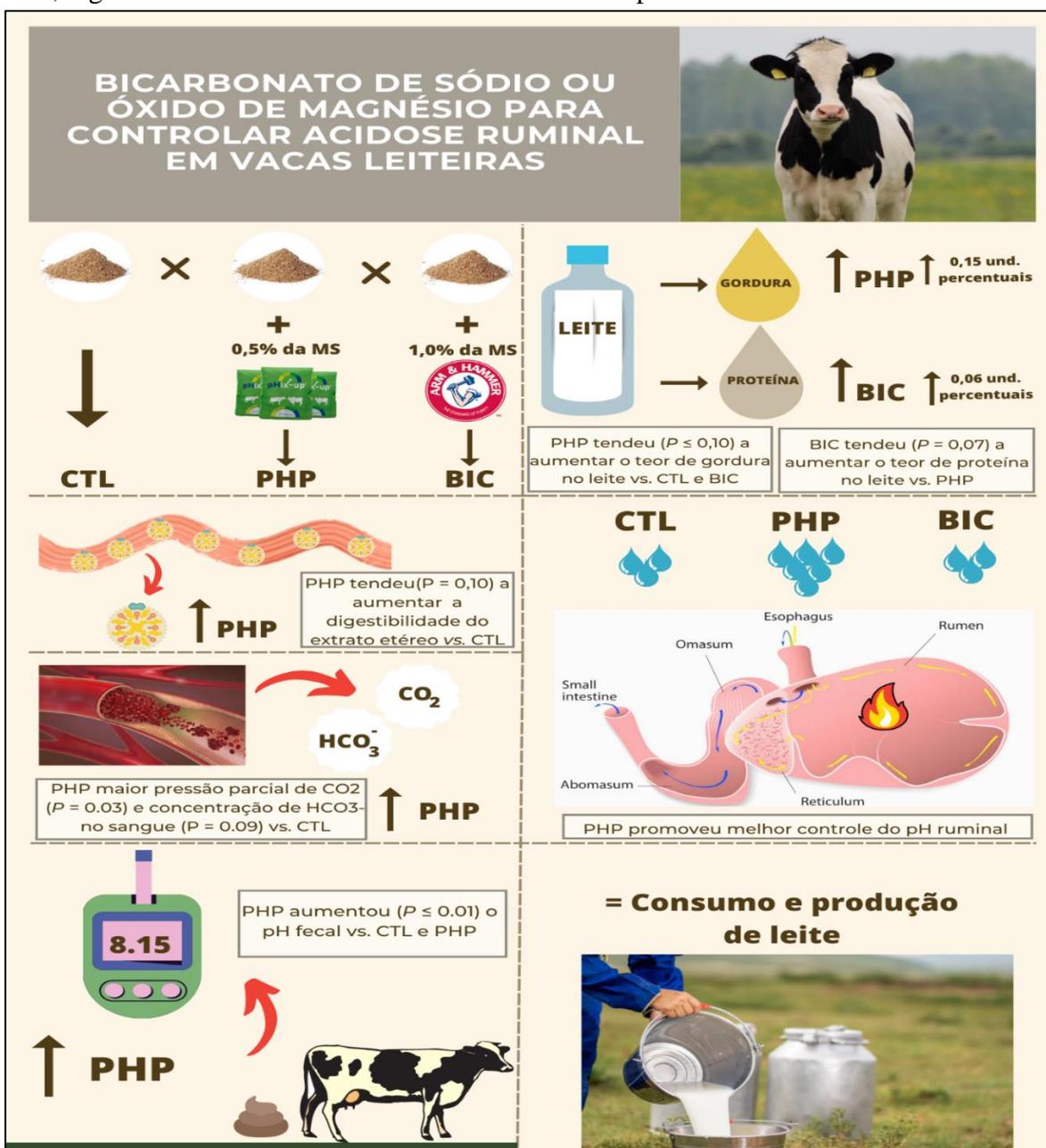
GENERAL ABSTRACT

Neutralizing pH feed additives might improve the performance of dairy cows through mechanisms related to the control of ruminal and systemic acidosis and a greater digestibility of the nutrients. A MgO calcinated source was developed to have high and persistent action on ruminal pH (pHix-Up, PHP). This experiment has evaluated the effect of sodium bicarbonate (BIC, 1% of DM) or PHP (0.5% of DM) addition in a basal diet (CTL) on dry matter intake, milk performance, milk fatty acids profile, digestibility of nutrients, rumen fermentative profile, ruminal and fecal pH, chewing behavior and venous acid-base balance. Fifteen Holstein cows (29.5 kg/d of milk and 193 ± 120 days in milk) formed 5 latin-squares 3×3 and received a sequence of the 3 treatments in periods of 21 days and 13 days of adaptation to the treatments. During the first 17 days of each period the cows were fed a 22.6% starch diet on a dry matter basis. At day 17, the feed was removed at 2200 h and a 31.6% starch diet was allowed *ad libitum* from days 18 to 21 and measurements were taken over time. The contrasts evaluated were: CTL vs PHP and BIC vs PHP. Before inducing acidosis, the dry matter intake (22.6 kg/d) and the milk production (27.5 kg/d) did not differ. PHP tended to increase the milk fat content (3.81%) in comparison to CTL (3.63%) and BIC (3.65%). PHP tended to increase the milk fat content of monounsaturated, unsaturated, stearic and oleic fatty acids and increased the daily secretion of monounsaturated, unsaturated and oleic. There was a tendency for increasing the total-tract ether extract to PHP in comparison with CTL (92.8 vs 91.5% of intake). During the acidosis induction the dry matter intake (22.9 kg/d) and the milk production (26.3 kg/d) also did not differ. BIC tended to increase the milk protein (3.36 vs 3.30%) and casein (2.63 vs 2.58%) content and increased the rumen microbial yield measured by the daily urine allantoin excretion. The blood pH, HCO_3^- and base excess were lower during the acidosis induction. PHP increased the partial pressure of CO_2 and tended to increase the concentration of bicarbonate ions and total CO_2 in the blood in comparison to CTL. The rumen fluid acetate to propionate ratio was 3.8 before the acidosis and 2.7 during the acidosis and was not affected by the treatments. The fecal pH was lower during the acidosis and was higher for PHP before and during the acidosis. During the acidosis, PHP tended to increase the mean ruminal pH (6.29 vs 6.24), tended to decrease the duration of $\text{pH} \leq 6.2$ (555 vs 653 min/d) and increased the minimum rumen pH (5.84 vs 5.72) in comparison to BIC. PHP also tended to increase the minimum rumen pH in comparison to CTL (5.75). The blood serum Mg concentration was higher for PHP and BIC tended to increase Na serum in comparison with PHP. Cows fed PHP before the acidosis tended to have lower meal (394 vs 408 min/d) and rumination time (460 vs 489 min/d and 73 vs 78 min/ruminal pH) than CTL. During the acidosis, PHP tended to reduce the eating (336 vs 353 min/d) and rumination time (19.4 vs 20.4 min/kg DM) in comparison to CTL. PHP supplementation to late lactation dairy cows with lower starch levels tended to increase the milk fat content and the milk fat secretion of unsaturated preformed fatty acids, the ether extract digestibility and the minimum ruminal pH. The neutralizing additives increased the buffering capacity of the blood during the acidosis and PHP induced a higher ruminal pH than BIC.

Keywords: Acidosis. Sodium bicarbonate. Digestibility. Magnesium oxide. Ruminal pH. Milk fat.

RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

Dieta para vacas leiteiras com alto teor de alimentos concentrados podem induzir acúmulo excessivo de ácidos graxos voláteis no fluido do rúmen e reduzir o pH. A acidose ruminal pode reduzir o consumo de alimentos, o desempenho leiteiro, a secreção de componentes do leite e a longevidade de vacas leiteiras. Aditivos alimentares neutralizantes podem auxiliar no controle do pH ruminal. Este experimento avaliou o efeito de uma fonte calcinada de óxido de magnésio (0,5% da matéria seca) ou bicarbonato de sódio (1% da matéria seca) sobre o consumo, desempenho leiteiro, digestibilidade, mastigação e perfil fermentativo e pH ruminal de vacas leiteiras. A inclusão do óxido do magnésio foi efetivo em aumentar os teores de gordura no leite, digestibilidade do extrato etéreo e em controlar o pH ruminal.



Efeito da adição de bicarbonato de sódio ou óxido de magnésio em dietas de vacas leiteiras.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	9
1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1 Aditivos neutralizantes do rúmen em produção animal	9
2.2 Consumo e desempenho leiteiro	11
2.3 Digestibilidade da gordura e perfil de ácidos graxos da gordura do leite.....	23
2.4 Digestibilidade de nutrientes no trato digestivo total.....	29
2.5 Perfil de fermentação ruminal.....	33
2.6 pH do rúmen e do trato digestivo.....	37
2.7 Absorção e metabolismo dos íons magnésio e sódio	43
2.7.1 Magnésio.....	44
2.7.2 Sódio.....	48
2.8 Parâmetros sanguíneos e balanço ácido básico.....	50
REFERÊNCIAS	56
ARTIGO - <i>EFFECT OF RUMEN NEUTRALIZERS ON DAIRY COWS BEFORE AND DURING A DIETARY STARCH CHALLENGE</i>	71

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Vacas em leiteiras apresentam alta demanda nutricional durante a lactação. Uma prática comum para suportar essa alta exigência é o fornecimento de grandes quantidades de concentrado, especialmente os ricos em amido. Essa prática, normalmente, leva a um comprometimento dos teores de fibra fisicamente efetiva da dieta (peFDN). Fibra fisicamente efetiva, é necessária para estimular a mastigação, conseqüentemente, salivação, melhorando o tamponamento do conteúdo ruminal, além do mais, promove a motilidade ruminal fazendo com que os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos pelo processo de fermentação entrem em contato com a parede ruminal para que ocorra a sua absorção. A rápida fermentação ruminal, quando em descompasso com a taxa de absorção de AGCC, pode resultar no acúmulo desses produtos da fermentação e afetar a regulação ácido básico do rúmen, levando a uma queda do pH ruminal. Uma alternativa para minimizar os efeitos negativos da utilização de dietas com altas quantidades de concentrado e amido é a adição de agentes neutralizantes.

Os agentes neutralizantes têm se mostrado efetivos, a depender da dieta basal, em controlar os efeitos negativos da acidose ruminal, tais como, queda na gordura do leite, baixo pH ruminal, diminuição do consumo e produção de leite. Dessa forma, o presente trabalho de pesquisa teve como objetivo elucidar, de maneira mais clara, as formas pelas quais, bicarbonato de sódio e óxido de magnésio agem para controlar a acidose ruminal. Os mecanismos responsáveis por ocasionar as diferentes variáveis respostas estão discutidos nas diversas seções dessa presente tese, juntamente com os resultados prévios reportados pela literatura. Sugestões de futuros trabalhos de pesquisa foram feitos para que novos avanços sejam alcançados com relação a literatura de agentes neutralizantes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aditivos neutralizantes do rúmen em produção animal

Os agentes neutralizantes podem ser definidos em tamponantes ou agentes alcalinizantes (ERDMAN, 1988). Tamponante é qualquer substância que em solução aquosa causa resistência a variação do pH da solução à adição de um ácido ou uma base forte, e para que isso ocorra três premissas devem ser respeitadas. A primeira é que o tamponante seja solúvel. A segunda é que precisa ser um ácido fraco, ou uma base fraca, ou que seja um sal resultante destes. A terceira é que o pKa (pH em que se tem 50% da substância na sua forma dissociada e 50% na sua forma não dissociada) seja próximo do pH da solução (ERDMAN,

1988). Agente alcalinizante é qualquer substância que em solução aquosa causa aumento do pH da solução (STAPLES; LOUGH, 1989).

O principal tamponante e agente alcalinizante na nutrição de ruminantes é, respectivamente, bicarbonato de sódio (BicNa) e óxido de magnésio (MgO) (ERDMAN, 1988; HU; MURPHY, 2005). Os primeiros relatos da utilização de BicNa e MgO na nutrição de vacas leiteiras é da década de 60 (DAVIS; BROWN; BEITZ, 1964; EMERY; BROWN; THOMAS, 1964; EMERY; BROWN; BELL, 1965). Desde então, inúmeros avanços com relação aos mecanismos de ação destes compostos foram alcançados (ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982; HU; MURPHY, 2005; KALSCHEUR *et al.*, 1997; RAZZAGHI *et al.*, 2022; RUSSELL; CHOW, 1993).

Um fato interessante que deve ser observado quanto a suplementação de MgO é que as características intrínsecas do produto à base de MgO parecem interferir na resposta animal, tais como temperatura de produção e tamanho de partícula, (GOFF, 2014; XIN; TUCKER; HEMKEN, 1989). O MgO é um produto com diversas aplicações, podendo ser desde uma alternativa que pode ser utilizada para o controle de problemas relacionados a acidose ruminal quanto usado para a construção de fornos e reatores industriais capazes de resistir a altas temperaturas. Dessa forma, é necessário entender que nem todo MgO apresenta as mesmas características e reatividades, o que pode ser explicado pelo seu processo de fabricação. O MgO normalmente é produzido por um processo industrial chamado de calcinação, reação endotérmica, na qual o carbonato de magnésio ($MgCO_3$), normalmente presente na natureza, quando aquecido forma o MgO com a liberação de CO_2 . A duração e a temperatura do processo de calcinação afetam a estrutura e a reatividade do óxido de magnésio formado (EUBANK, 1951), conseqüentemente, influenciando na destinação que esse produto terá. De acordo com esse autor o MgO pode ser dividido em MgO sinterizado ou calcinado. O primeiro, passa pelo processo de calcinação à mais altas temperaturas, enquanto que o segundo, temperaturas menores. Quando em menores temperaturas, ao redor de $300^\circ C$, há perda de gases (CO_2) fazendo com que a estrutura do MgO fique porosa, com uma grande área de superfície interna, conseqüentemente, grande reatividade. Entretanto, quando atingida temperaturas acima de $900^\circ C$ o MgO passa por um processo de recristalização, tornando-se muito menos reativo (EUBANK, 1951). Ao contrário do que ocorre para MgO, as características intrínsecas das fontes de BicNa não parecem interferir na resposta animal, muito provavelmente pela alta solubilidade e capacidade do BicNa se ionizar em soluções aquosas (GOFF, 2018). De acordo

com esses autores, cerca de 100% das moléculas de BicNa se dissociam quando em solução, formando Na⁺.

2.2 Consumo e desempenho leiteiro

De acordo com Allen (2000), o consumo de matéria seca (CMS) é determinado pelo tamanho e pela frequência das refeições. Os fatores que influenciam o tamanho das refeições têm sido bastante estudados e são relacionados à saciedade. Os fatores que influenciam a frequência das refeições, por sua vez, têm sido menos estudados e são relacionados a fome, ou à vontade de se alimentar. Ou seja, quanto mais rápido um animal se saciar, menor será a sua refeição, e quanto mais vezes ele sentir fome no dia, maior será o número de refeições.

A regulação do CMS parece ser fruto de um mecanismo integrado de diferentes sinais, sejam eles físicos ou químicos, que atuam sobre os centros de saciedade do cérebro (ALLEN, 2000). Dietas contendo baixa relação entre forragens e concentrados, normalmente têm alto poder acidogênico, ou seja, grande capacidade de gerar ácidos graxos voláteis (AGV) oriundos da fermentação ruminal (KRAUSE; OETZEL, 2006). Nesse tipo de dieta o teor de amido e sua taxa de degradação ruminal são importantes determinantes do CMS. Fatores como tipo, forma de conservação e processamento do grão, afetam diretamente a degradação ruminal do amido (MILLS; FRANCE; DIJKSTRA, 1999). Normalmente, nesse tipo de dieta temos uma maior proporção de propionato como produto da fermentação ruminal (ROGERS *et al.*, 1979). O aumento na taxa de produção e na absorção de propionato pode induzir queda no CMS, através de mecanismos relacionados a maior geração de equivalentes redutores, produzidos pela oxidação do propionato pelo fígado, o que levaria a uma diminuição na frequência de despolarização das fibras aferentes de neurônios vagais levando à saciedade (ALLEN, 2000).

Existem diferentes teorias para explicar o mecanismo de ação dos agentes neutralizantes como o MgO e o BicNa sobre o desempenho animal. Dentre essas teorias, podemos destacar o maior fornecimento de bases capazes de neutralizar os AGV formados durante o processo de fermentação ruminal. Dessa forma, há o aumento ou menor variação do pH ruminal, o que resultaria em mais AGV na sua forma não protonada (acetato, propionato e butirato) quando comparado a animais não consumindo agentes neutralizantes. A velocidade de absorção dos AGV é mais rápida quando eles estão na forma protonada (DIJKSTRA *et al.*, 1993). Logo os agentes neutralizantes teriam a capacidade de diminuir a velocidade de absorção dos AGV, tendo como ênfase, principalmente, o propionato, importante por causar saciedade. Pela equação de Henderson-Hasselbach, $\text{pH} = \text{pKa} + \text{LOG} \left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right)$, temos que em pH 6,0 a proporção de ácido propiônico ($\text{pKa} = 4,88$) na forma não protonada é 13,2 vezes maior que na

forma protonada, e em pH 5,6 esta relação cai para 5,2 vezes. Outro ponto importante que deve ser levado em consideração se tratando do processo de absorção de AGV na sua forma não protonada é que, dependendo do mecanismo absorptivo utilizado, pode haver influxo de íons bicarbonato para o rúmen (DIJKSTRA *et al.*, 2012), auxiliando no controle do pH ruminal. Estimasse que cerca de metade do influxo diário de íons bicarbonato ocorra através da parede ruminal e a outra metade pela saliva (DIJKSTRA *et al.*, 2012).

Vacas de leite de alta produção podem produzir até 160 moles de AGV por dia (RUSSELL, 2002). Um animal com CMS de 25 kg/d em uma dieta contendo BicNa a 1% da MS, sendo a inclusão típica em dietas de vacas leiteiras de 0,7 à 1,5% da MS (HU; MURPHY, 2005), ou em uma dieta contendo MgO a 0,5% da MS, metade da dose de BicNa conforme proposto por Bach *et al.* (2018) teria um consumo de aproximadamente 3,0 moles/d de BicNa ou MgO, uma vez que a massa molar do BicNa é de 84,0 g/mol e do MgO é 40,3g/mol. Nesse exemplo, a relação entre moles de AGV produzido e moles de agente neutralizante consumido através da dieta seria de 53,3:1. Valores que nos fazem refletir e até mesmo duvidar que a ação dos agentes neutralizantes, BicNa e MgO, seja apenas por tamponamento ruminal. O tamponamento sanguíneo, conforme discutido em seções seguintes, também parece explicar a ação desses agentes neutralizantes em vacas leiteiras (GOFF, 2018; PEREIRA *et al.*, 1999; ROGERS *et al.*, 1985).

O alimento quando ingerido pelos ruminantes passa inicialmente pelos pré-estômagos. O rúmen é o local aonde ocorre a maior parte da degradação dos alimentos por ação dos microrganismos ruminais. As taxas de passagem e de degradação determinam o quanto do alimento ingerido passa intacto pelo rúmen ou é degradado. Quanto maior a taxa de passagem, maior a proporção do alimento ingerido que passa intacto pelo rúmen e uma menor proporção é degradada pelos microrganismos ruminais.

De acordo com Russell e Chow (1993), o mecanismo de ação dos agentes neutralizantes parece não ser apenas pela neutralização de ácidos oriundos da fermentação ruminal, mas também por efeito direto sobre a taxa de passagem da fase líquida ruminal por aumento da ingestão de água. O rúmen representa cerca de um sétimo da massa de um ruminante, sendo dessa forma um importante compartimento em que a pressão osmótica deve ser precisamente regulada para evitar tanto hemoconcentração como hemodiluição. Harrison *et al.* (1975) infundiram tampões no rúmen e perceberam que a taxa de passagem da fase líquida aumentou, o que foi acompanhado do aumento do fluxo de amido para fora do rúmen e na relação entre acetato e propionato no fluído. Um fato interessante é que quando água foi infundida

diretamente no rúmen não houve efeito sobre a taxa de passagem e perfil fermentativo, indicando que a maioria da água infundida não passou para o omaso, mas foi absorvida através da parede ruminal. Esses resultados somados à relativa constância da pressão osmótica do rúmen, mesmo com a infusão de água, sugerem que o transporte de água através da parede ruminal é um mecanismo efetivo em regular a pressão osmótica (HARRISON *et al.*, 1975). A maior taxa de reciclagem da fase líquida do rúmen pode ser alcançada através da infusão de cloreto de sódio ou bicarbonato de sódio (ROGERS *et al.*, 1979). Nestas infusões a maior taxa de reciclagem da fase líquida do rúmen foi associada a um maior consumo de água pelo animal. O uso de aditivos neutralizantes do rúmen pode aumentar o CMS, uma vez podem promover maior consumo de água e promover maior taxa de passagem da fase líquida e de amido, levando a uma menor concentração e fluxo ruminal de propionato.

Infelizmente, poucos trabalhos na literatura têm se preocupado em medir o consumo de água, principalmente em experimentos avaliando a inclusão de MgO, uma variável fisiológica extremamente importante. Edwards e Poole (1983), avaliaram o efeito da inclusão de 2% de BicNa fornecido através de dieta total em vacas em início de lactação. Os autores observaram que o fornecimento de BicNa aumentou o consumo diário de água do grupo de animais comparado com animais não suplementados (45 vs 51 L/d), apesar do consumo individual de água por animal não ter sido mensurado no experimento.

Pérez-Ruchel, Repetto e Cajarville (2014) avaliaram o efeito da suplementação de ovinos com 2% da MS consumida de uma mistura contendo 75% de BicNa e 25% MgO. A mistura de aditivos neutralizantes foi fornecida, por via oral, uma vez ao dia antes do fornecimento da forragem. A dose diária foi ajustada com base no consumo de MS observado no dia anterior e os animais tiveram acesso a forragem temperada por 6 h/d. Os animais consumindo os neutralizantes ingeriram mais água total (1278 vs 897 mL/d, $P < 0,05$) e houve tendência de aumento na ingestão de água livre (632 vs 322 mL/d, $P = 0,08$) relativamente aos não suplementados. Os autores associaram a maior ingestão de água à redução do tempo de retenção médio da digesta no trato digestivo total (53,8 vs. 45,2 horas, $P < 0,09$), mensurado através da utilização de fibra em detergente neutro (FDN) cromo mordente. Em vacas leiteiras, o fornecimento de 1,7% de BicNa em dieta contendo 33% de forragem e 67% de concentrado e com silagem de milho como forragem única também aumentou o consumo médio de água do grupo (100,4 vs 79,4 kg/d) (ESCOBOSA *et al.*, 1984).

Khelil-Arfa, Faverdin e Boudon (2014) avaliaram o efeito do teor de Na na dieta (0,21 vs 0,49% da MS da dieta) em diferentes temperaturas ambiente (15°C e 66,0 de Índice de

Temperatura e Umidade ou 28°C e 78,7 de ITU) sobre a partição da água ingerida por vacas lactantes e não-lactantes. O aumento de Na na dieta foi feito por aumento no teor de BicNa na dieta (1,9 vs 0,5% da MS). A ingestão de água foi maior para as vacas em lactação consumindo maior teor de BicNa (84,0 vs 78,5 kg/d, $P \leq 0,05$), o que foi associado a maior ($P \leq 0,01$) excreção de urina tanto em vacas não-lactantes (15,7 vs 11,6 kg/d) como em lactantes (22,3 vs 15,9 kg/d). Nas vacas ingerindo mais Na a ingestão de água por unidade de CMS tendeu a ser mais alta ($P \leq 0,10$) tanto para vacas não-lactantes (2,58 vs 2,39 kg/kg de CMS) como para vacas em lactação (4,22 vs 4,01 kg/kg de CMS). A excreção de urina também aumentou ($P \leq 0,01$) para vacas secas (1,13 vs 0,84 kg/kg de CMS) e em lactação (1,11 vs 0,81 kg/kg de CMS) com o maior teor de BicNa na dieta. De acordo com os autores, o aumento da ingestão de água com o maior fornecimento de BicNa se deve ao maior estímulo do centro da sede por aumento na osmolaridade do plasma devido ao maior aporte de Na. Ainda de acordo com esses autores, a maior excreção urinária provavelmente se deve a uma inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona, o que levaria a uma menor reabsorção renal de Na e água em resposta a aumento do volume de líquido extracelular causado por aumento no consumo de Na. O aumento no nível de suplementação de Na (25 vs 210 g/d) reduziu a concentração sanguínea de aldosterona (12 vs 36 pg/mL) em vacas gestantes e não-lactantes (ROUFFET *et al.*, 1990). A aldosterona é hormônio esteroide, sintetizado a partir do colesterol na zona glomerulosa das glândulas adrenais com importantes funções sobre o balanço eletrolítico. A sua principal função é aumentar na reabsorção de Na pelos rins através do aumento de canais de Na na membrana apical e da enzima Na/K ATPase na membrana baso-lateral (SHERWOOD; KLANDORF; YANCEY, 2013). A reabsorção de Na ocasionado pela secreção de aldosterona também leva a reabsorção de água pelo mecanismo da osmose.

Os aditivos neutralizantes também podem afetar o consumo de água e a taxa de passagem da fase líquida do rúmen em bovinos jovens. Kellaway *et al.* (1977) forneceram para bezerros teores crescentes de Na no concentrado (0,2, 1,1, 2,0 e 2,9% da MS), oriundo de BicNa ou NaCl. Houve aumento ($P < 0,01$) linear para o consumo diário de água (3,42, 3,99, 4,07, 5,15 L/kg de CMS) com maior teor de Na na dieta, não havendo diferença entre as fontes. A inclusão de 6% de BicNa no concentrado de bezerros aumentou o consumo de água (6,37 vs 4,90 L/d) e o fluxo de líquido do rúmen (25,5 vs 23,2 L/d) (KELLAWAY *et al.*, 1978).

Apesar do consumo de água ser uma variável pouca avaliada em experimentos, existem evidências indiretas de que aditivos neutralizantes podem aumentar a ingestão de água em bovinos. Aumento do volume urinário (HU; MURPHY, 2004; KILMER; MULLER; SNYDER,

1981; THOMAS *et al.*, 1984) e diminuição na concentração urinária de creatinina (CASSIDA; MULLER; SWEENEY, 1988; THOMAS *et al.*, 1984) normalmente ocorre com o fornecimento de aditivos neutralizantes. Entretanto, existem experimentos nos quais não foi observado efeito de aditivos neutralizantes sobre a taxa de passagem da fase fluída do rúmen (HAALAND; TYRRELL, 1982; ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982; STAPLES *et al.*, 1988), supostamente em decorrência do baixo número de observações e de poder estatístico para detectar diferenças significativas entre tratamentos.

O compilado de trabalhos publicados (TABELA 1) sugere que ocorre aumento ou ausência de efeito da adição de BicNa ou MgO sobre o CMS e a produção de leite de vacas leiteiras. As características da dieta parecem afetar o padrão de resposta. Entre elas, se destacam o tipo de forragem e o teor de fibra na dieta (HU; MURPHY, 2005) e a proporção de concentrado (KENNELLY; ROBINSON; KHORASANI, 1999). Hu e Murphy (2005) em uma metanálise reportaram que a resposta em CMS ao fornecimento de BicNa parece depender da dieta basal. As dietas foram categorizadas como 1) MS, quando as dietas tinham como fonte de forragem unicamente ou majoritariamente silagem de milho. 2) NMS, quando as dietas tinham outras forragens, sem ser silagem de milho, como a única ou como porção majoritária da forragem da dieta. BicNa, seja em inclusão moderada (0,7-1,0% da MS) ou alta (1,0-1,5% da MS) somente afetou o CMS quando incluído em dietas MS. Entretanto, teor de fibra e tipo de forragem foram confundidos, sendo que dietas MS tiveram menores teores de fibra. A inclusão de 1,2% da MS de BicNa a dietas com 50% ou 75% de alimentos concentrados na MS aumentou a produção de leite apenas em dietas com maior teor de concentrado (32,0 vs 35,1 kg/d, $P = 0,01$ para interação entre teor de concentrado e BicNa) (KENNELLY; ROBINSON; KHORASANI, 1999).

Erdman (1988) em sua revisão de literatura avaliou o efeito do fornecimento de aditivos neutralizantes para vacas leiteiras. Os dados resumiram o achado de 50 publicações, 82 experimentos e 3.065 vacas em diferentes regimes alimentares. O autor avaliou o efeito da inclusão de BicNa e MgO à dietas diferindo no teor de forragem. As dietas foram divididas em com teor de forragem baixo (< 30% da MS) ou alto (> 30% da MS). De acordo com o autor, em trabalhos onde silagem de milho era a forragem única os animais suplementados com BicNa tiveram aumento de 0,5 kg/d no consumo de matéria seca, 0,6 kg/d na produção de leite e 1,1 kg/d no leite corrigido para gordura quando comparados aos animais não suplementados ($P < 0,05$). Entretanto, o efeito positivo dos aditivos neutralizantes sobre o consumo e o desempenho leiteiro parecem ser menores quando silagens de pré-secado de alfafa e gramíneas fazem parte

da dieta. Alguns fatores como, o maior teor de fibra oriunda de alfafa quando comparado com silagem de milho em uma mesma relação entre forragens e concentrados na dieta e o maior poder tampão da alfafa em comparação a silagem de milho parecem explicar parte da diferença da efetividade dos aditivos neutralizantes em dietas diferindo no tipo da forragem (DePETERS *et al.*, 1984).

O fornecimento de agentes neutralizantes normalmente não afeta o teor e a produção de proteína e lactose no leite (BACH *et al.*, 2018; RAZZAGHI *et al.*, 2021; RAZZAGHI *et al.*, 2022). Hu e Murphy (2005) em sua metanálise compilaram dados de 30 experimentos, incluindo 73 tratamentos e 369 vacas e não observaram o efeito do fornecimento de BicNa sobre o teor e a produção de proteína no leite, independentemente da forragem utilizada. Entretanto, alguns trabalhos pontuais na literatura demonstram, tanto aumento como diminuição com o uso de aditivos neutralizantes sobre esses parâmetros.

Kennelly, Robinson e Khorasani (1999) avaliaram a inclusão de 1,2% da MS de BicNa em dietas de baixa (50% da MS) e alta (75% da MS) inclusão de concentrado. A suplementação de BicNa na dieta com alta inclusão de concentrado reduziu o teor de proteína no leite (3,10 vs 3,34%, $P = 0,01$) e aumentou o teor de lactose (4,85 vs 4,69%, $P < 0,05$), entretanto justificativas para esses resultados não foram dadas. Thomas *et al.* (1984) avaliaram 1% da MS de BicNa e 0,5% da MS de três MgO com diferentes granulometrias em vacas leiteiras em meio de lactação. O fornecimento dos aditivos neutralizantes reduziu ($P < 0,01$) o teor de proteína no leite, entretanto os autores relataram não ter uma explicação do porque animais controle tiveram maior teor de proteína no leite.

Cabrita *et al.* (2009), em experimento com delineamento do tipo Quadrado Latino 4x4, avaliaram o efeito da suplementação de uma mistura de BicNa (0,65% da MS) e MgO (0,48% da MS) em dietas contendo milho ou trigo como fonte de amido. Os aditivos neutralizantes aumentaram o teor de proteína no leite apenas na dieta contendo trigo (2,88 vs 2,79%, $P = 0,01$), nenhuma explicação foi dada pelos autores suportando esse resultado. Em outro experimento (ESCOBOSA *et al.*, 1984), a adição de 1,7% da MS de BicNa em dieta de 33% silagem de milho da MS aumentou o teor de proteína do leite (3,43 vs 3,31%, $P < 0,05$).

Uma possível justificativa para a redução do teor ou produção de proteína no leite quando se suplementa aditivos neutralizantes, BicNa e MgO, seria o aumento na taxa de passagem da fase fluída do rúmen por aumento na ingestão de água, o que, dependendo do grau de processamento e tipo de amido, poderia levar a menos amido sendo degradado no rúmen. Logo, menos carboidrato rapidamente fermentável estaria disponível para crescimento

microbiano no rúmen. Entretanto, maior taxa de passagem da fase fluída do rúmen poderia aumentar o teor e a secreção diária de proteína no leite por maior eficiência na síntese de proteína microbiana por diluição da manutenção (HARRISON *et al.*, 1975). Microorganismos ruminais precisam gastar parte da energia produzida, ATP, para manter as suas células, seja por mecanismos relacionados a motilidade, renovação de constituintes celulares ou para o reestabelecimento do gradiente iônico através da membrana celular (RUSSELL, 2002). Dessa forma, quanto maior a taxa de diluição menor será a manutenção dos microorganismos proporcionalmente a energia produzida (ATP). Adição de 2% da MS de uma mistura de aditivos neutralizantes (75% BicNa e 25% MgO) na dieta de ovinos aumentou a excreção total de derivados de purina na urina (0,47 vs 0,22 g/d, $P < 0,05$) (PÉREZ-RUCHEL; REPETTO; CAJARVILLE, 2014). Estas duas possibilidades de mecanismo de ação sugerem que o efeito antagônico de aditivos neutralizantes sobre a secreção de proteína no leite, via maior taxa de passagem de amido ou ganho na eficiência de síntese microbiana no rúmen, poderiam resultar em ausência de efeito destes aditivos sobre a secreção de proteína do leite.

Tabela 1- Consumo de matéria seca (CMS) e produção de leite (PL) de vacas leiteiras suplementadas com BicNa ou MgO.

Agente neutralizante	Inclusão (% da MS)	Relação forragem:concentrado	Forragem	CMS		PL		Estudo
				kg/d ¹	Δ	kg/d	Δ	
MgO	0,40	35:65	26% silagem de milho 5% silagem de alfafa 4% feno de alfafa	26,4	+0,3	44,8	+0,2	(RAZZAGHI <i>et al.</i> , 2022)
BicNa	0,80	40:60	28% silagem de milho 12% feno de alfafa	22,8	+0,9	33,4	+1,6*	(RAZZAGHI <i>et al.</i> , 2021)
MgO	0,40							
BicNa	0,70	46:54	22% silagem de gramínea 22% silagem de milho 1,7% palha de trigo	20,7	+1,9**	32,2	+0,2	(NEVILLE <i>et al.</i> , 2019) Experimento 2
BicNa	0,80	35:75	17,5% feno de aveia 17,5% feno de alfafa	23,1	+1,1	27,6	+1,5*	(CRUYWAGEN <i>et al.</i> , 2015)

BicNa	0,85	49,4:50,6	34,2% silagem de milho 5,7% feno de alfafa 9,5% pré-secado de azevém	22,1	+0,9	43,0	+1,2	(BERNARD <i>et al.</i> , 2014)
(BicNa + MgO)	(0,65 + 0,48)	50:50	45% silagem de milho 5% palha de trigo	22,6	-0,2	36,8	-0,1	(CABRITA <i>et al.</i> , 2009)
BicNa	1,20	50:50	25% silagem de alfafa 25% silagem de gramínea	18,3	+1,0	21,9	+1,6	(KHORASANI; KENNELLY, 2001)
		25:75	12,5% silagem de alfafa 12,5% silagem de gramínea	19,9	+0,7	24,3	+0,4	
BicNa	1,20	50:50	25% silagem de alfafa 25% silagem de gramínea	20,4	-0,2	32,9	-0,9	(KENNELLY; ROBINSON; KHORASANI, 1999)
		25:75	12,5% silagem de alfafa 12,5% silagem de gramínea	20,2	-0,2	30,5	+4,6*	

		31,5:68,5 (sem subproduto fibroso)	17,2% silagem de alfafa 14,3% silagem de milho	21,1	+2,3	29,3	+2,5	
BicNa	0,8	31,5:68,5 (47% subproduto fibroso)	17,2% silagem de alfafa 14,3% silagem de milho	24,2	+0,2	31,8	+0,5	(PEREIRA <i>et al.</i> , 1999) ² Experimento contínuo
		49:51	34,5% silagem de alfafa 14,5% silagem de milho	22,7	+0,9	30,4	+1,6	
		60:40	36% silagem de milho 24% pré-secado de alfafa	20,6	+1,3	28,1	+1,2	
(BicNa + MgO)	(1,50 + 0,50)	25:75	15% silagem de milho 10% pré-secado de alfafa	23,7	+0,4	31,5	-1,7	(KALSCHEUR <i>et al.</i> , 1997)
BicNa	0,75	40:60	40% silagem de milho	19,6	0,0	26,3	-0,5	(ERDMAN; SHARMA, 1989)
BicNa	1,2	40:60	40% silagem de gramínea	21,7	-1,4*	34,5	-0,1	(HARRISON; RILEY; LONEY, 1989)

BicNa	0,8				+1,5		-1,3	
MgO	0,4	43:57	36% feno de alfafa	20,8	+1,1	31,6	-0,5	(ARAMBEL <i>et al.</i> , 1988)
(BicNa + MgO)	(0,8 + 0,4)		7% silagem de milho		+1,1		+0,5	
BicNa	1,7	33:67	33% silagem de milho	17,9	+3,2*	18,1	+1,1	(ESCOBOSA <i>et al.</i> , 1984)
BicNa	2,0	40:60	40% silagem de azevém	13,9	+1,0	24,1	+0,8	(EDWARDS; POOLE., 1983)
BicNa	1,0				+1,2		-3,1	(ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982)
MgO	0,8	40:60	40% silagem de milho	18,6	+1,2	34,6	+0,6	Experimento 1
(BicNa + MgO)	(1,0 + 0,8)				+1,0		-1,2	
BicNa	1,0				+1,0		+0,5	(ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982)
MgO	0,8	40:60	40% silagem de milho	16,4	+0,6	24,6	+0,6	Experimento 2
(BicNa + MgO)	(1,0 + 0,8)				+0,7		+0,5	

BicNa	1,5				+2,2*		+1,6	
MgO	0,8	40:60	40% silagem de milho	18,5	+0,7	34,5	+0,4	(ERDMAN <i>et al.</i> , 1980)
(BicNa + MgO)	(1,5 + 0,8)				+2,1*		+3,8*	

¹Valores comparados ao tratamento controle e variação da resposta dos animais suplementados (Δ): + aumento – redução. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,10$

²Comparações diretas entre os tratamentos contendo ou não BicNa não foram feitas. Para efeito de BicNa: $P < 0,01$ em CMS, $P = 0,02$ em produção de leite

2.3 Digestibilidade da gordura e perfil de ácidos graxos da gordura do leite

Como iremos tratar nesse capítulo sobre perfil de ácidos graxos (AG) no leite, é primeiro preciso entender quais são os grupos que compõe a gordura do leite. A gordura do leite é composta por três grandes grupos de AG: De novo, mistos e pré-formados. De acordo com Woolpert *et al.* (2017), os AG De novo são aqueles de 4 a 14 carbonos e são sintetizados pela glândula mamária através da utilização de precursores da fermentação ruminal, o acetato e o butirato. Os AG mistos são aqueles de 16 carbonos e podem ser sintetizados tanto pela glândula mamária, através de precursores da fermentação ruminal, o acetato e butirato, como também serem incorporados ao leite, diretamente do sangue, através de AG previamente absorvidos da dieta ou mobilização pelo tecido adiposo. Os AG pré-formados são os de 18 ou mais carbonos incorporados ao leite, diretamente do sangue, através da sua prévia absorção da dieta ou mobilização pelo tecido adiposo.

A depressão da gordura do leite induzida por fatores dietéticos pode ser definida como a redução no teor e produção de gordura decorrente de alteração na rota de biohidrogenação de lípidos insaturados no rúmen, sem que ocorra queda na produção de leite ou de outros componentes do leite (BAUMAN; GRIINARI, 2001). O ácido linoleico (C18:2, cis-9, cis-12), durante o processo normal de biohidrogenação, é primeiramente isomerizado, formando o ácido linoleico conjugado (CLA) (C18:2, cis-9, trans-11), que é rapidamente hidrogenado formando o ácido vacênico (C18:1, trans-11) que levará a formação do ácido esteárico (C18:0) através de mais uma etapa de hidrogenação (QIU *et al.*, 2004). A isomerização do ácido linoleico e a biohidrogenação do AG C18:2, cis-9, trans-11 ocorrem de maneira rápida. Entretanto, a conversão do ácido vacênico em ácido esteárico é a etapa limitante (HARFOOT; HAZELWOOD, 1997). Uma característica comum de dietas com capacidade de induzir depressão na gordura no leite é uma alteração na rota de biohidrogenação de trans-11 para trans-10 (ALVES; BESSA, 2014). Essas mudanças que ocorrem no ambiente ruminal são acompanhadas por mudanças no perfil dos AG da gordura do leite, normalmente, através de reduções na proporção e secreção de AG de cadeia curta e média, conseqüentemente, aumentando a proporção de AG pré-formados sem que se altere a secreção diária dos mesmos (LOCK *et al.*, 2008; RICO; HARVATINE, 2013). Isso sugere que ocorre inibição mais expressiva da síntese de novo do que da captação de AG pré-formados pela glândula mamária (BAUMAN; GRIINARI, 2001; BAUMAN; HARVATINE; LOCK, 2011). Entretanto, em algumas situações a captação dos AG pré-formados pode ser mais afetada do que a síntese de novo (REGO *et al.*, 2005).

Infusões no abomaso de CLA C18:2, trans-10, cis-12 nas quantidades de 3,5, 7,0 e 14,0 g/d reduziram ($P < 0,01$) a secreção mamária de gordura por dia em 25, 33 e 50%, e o teor de gordura do leite em 24, 37 e 46%, respectivamente, sem afetar a produção de leite (25,6 L/d) e o teor (3,06%) e secreção (779 g/d) de proteína comparativamente ao tratamento controle (BAUMGARD; SANGSTER; BAUMAN, 2001). Os AG De novo, mistos e pré-formados tiveram suas secreções no leite, em mmol/d, reduzidas com as infusões do CLA C18:2, trans-10, cis-12. Entretanto, na dose mais baixa de infusão, a redução, em comparação ao controle em mmol/d, dos três grupos de AG foi equivalente, sendo que a medida que a dose de infusão de C18:2, trans-10, cis-12 aumentou houve uma redução mais expressiva dos De novo em comparação aos mistos e pré-formados. De acordo com os autores, quanto maior a quantidade de C18:2 trans-10, cis-12, maior a inibição dos AG De novo comparativamente aos AG mistos e pré-formados. Nesse mesmo trabalho, diminuição da atividade da enzima delta-9-desaturase foi evidenciada pelo aumento da relação dos AG saturados maiores que 14 C e seus respectivos AG monoinsaturados. Peterson, Matitashvili e Bauman., (2004) mostraram *in vitro* diminuição progressiva da lipogênese com o aumento da concentração (0, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{mol/L}$) do AG C18:2, trans-10, cis-12. Houve redução na abundância de mRNA das enzimas acetil-coa carboxilase, ácido graxo sintetase e estaroil-coa desaturase quando C18:2, trans-10, cis-12 estava presente. Esses autores demonstraram que SREBP-1 é responsável pela regulação da expressão de enzimas lipogênicas importantes em bovinos, sendo que na presença do AG C18:2, trans-10, cis-12 não houve redução na expressão do mRNA do SREBP-1, nem da proteína precursora do SREBP-1, mas sim do componente ativo do SREBP-1. O SREBP-1 é sintetizado como precursor (125 KDa), fica no retículo endoplasmático até ser clivado e liberado na sua forma ativa (68 KDa), esse por sua vez é o componente responsável por migrar até o núcleo e ativar a transcrição de genes. Os resultados desse experimento suportam que os efeitos *in vivo* do CLA C18:2, trans-10, cis-12 sobre a gordura do leite se deve a alterações no fator de transcrição SREBP-1.

Inúmeros são os efeitos do CLA C18:2, trans-10, cis-12 em diferentes espécies, entre eles, redução na deposição de gordura, redução da atividade da enzima lipoproteína lipase (LPL), diminuição da proliferação e a diferenciação de células precursoras de adipócitos, aumento do gasto energético dos animais através do aumento de proteínas desacopladoras, aumento da oxidação de ácidos graxos através do aumento da atividade da enzima carnitina-palmitoil transferase, diminuição da atividade da enzima estaroil-coa desaturase e aumento da apoptose de adipócitos (MERSMANN, 2002).

Razzaghi *et al.* (2022), em um experimento com 24 vacas multíparas, avaliaram o efeito da inclusão de 0,4% de MgO em uma dieta com alta capacidade de deprimir a gordura no leite (35% de forragem, 35,5% de amido, 29,0% de FDN na MS). Os autores observaram aumento no teor e na produção de gordura do leite em resposta à suplementação com MgO por 20 dias ($P = 0,01$). O aumento na secreção de gordura ocorreu a partir do quarto dia de suplementação do MgO, se manteve durante todo o restante do período de suplementação, e se estendeu até o sétimo dia após o fim do fornecimento de MgO. Esses dados sugerem que a suplementação com MgO parece ter efeito residual curto sobre o teor e a secreção de gordura no leite. O aumento da gordura do leite foi associado a mudança na rota de biohidrogenação do AG C18:2, cis-9, cis-12 no rúmen, uma vez que com apenas dois dias de suplementação animais recebendo MgO tiveram menor relação entre C18:1, trans-10 e C18:1, trans-11 na gordura do leite que vacas no tratamento controle (0,69 vs 0,98, $P < 0,05$). A suplementação de MgO tendeu ($P \leq 0,10$) a aumentar a proporção dos AG de novo (21,9 vs. 21,1 g/100g de AG) e mistos (33,1 vs 31,9 g/100g de AG), sem alterar a proporção dos pré-formados (45,9 g/100g de AG). O MgO reduziu a proporção na gordura de C18:1, trans-10 (1,19 vs 1,49 g/100g de AG, $P < 0,05$), aumentou C18:1, trans-11 (1,78 vs 1,54 g/100g de AG, $P < 0,05$) e tendeu a aumentar C16:0 (31,2 vs 30,1 g/100g de AG, $P \leq 0,10$), sem afetar C18:0 (11,3 g/100g de AG) e C18:1, cis-9 (22,9 g/100g de AG). Experimentos têm demonstrado que a inclusão de aditivos neutralizantes, BicNa e MgO, na dieta de vacas leiteiras pode reduzir o teor de C18:1, trans-10 e de AG trans totais na gordura no leite (CABRITA *et al.*, 2009; RAZZAGHI *et al.*, 2020; RAZZAGHI *et al.*, 2021), provavelmente por reduzir o fluxo duodenal, absorção intestinal, e consequente incorporação desses AG no leite (KALSCHEUR *et al.*, 1997). Entretanto, esses autores observaram redução do fluxo duodenal do AG C18:1, trans, através do fornecimento de 2% da MS de uma mistura de BicNa e MgO (75:25) em dietas com baixo teor de forragem (25% da MS), mas não observaram redução em dietas de alta forragem (60% da MS).

O aumento do teor e produção de gordura do leite com o uso de MgO, BicNa ou mistura de ambos é frequentemente relatado na literatura (EMERY; BROWN; BELL, 1965; HUBER *et al.*, 1969; KALSCHEUR *et al.*, 1997; RAZZAGHI *et al.*, 2021; XIN; TUCKER; HEMKEN, 1989). Entretanto, o aumento da gordura no leite através da suplementação de BicNa parece ser mais expressiva em dietas de maior poder acidogênico (ERDMAN, 1988). Kennelly, Robinson e Khorasani (1999) avaliaram a inclusão de 1,2% da MS de BicNa a dietas com 50% ou 75% de alimentos concentrados na MS. A suplementação com BicNa aumentou a produção (1,10 vs 0,72 kg/d) e o teor de gordura (3,18 vs 2,37%) do leite apenas na dieta de alto concentrado. Na

metanálise de Hu e Murphy (2005) observou-se aumentos de 0,27 unidades percentuais no teor de gordura do leite e 105 g/d na produção de gordura apenas quando BicNa foi adicionado a dietas contendo silagem de milho como fonte de forragem única ou principal, não ocorrendo efeito quando a forragem não era silagem de milho.

Além do possível efeito de aditivos neutralizantes sobre a biohidrogenação de lípidos insaturados no rúmen, o efeito positivo de MgO sobre a secreção mamária de gordura pode envolver outro mecanismo. A formação de sais de Ca ou Mg com AG livres pode ocorrer no rúmen e intestinos (JENKINS; PALMQUIST, 1984; STEELE, 1983). A formação de sais é favorecida em pH mais alto (SUKHIJA; PALMQUIST, 1990). Entretanto, vários fatores podem limitar a formação de sais de Ca e Mg no rúmen. Dentre eles, estão o tipo e a quantidade de mineral fornecido, tipo do AG, pH ruminal e possivelmente a taxa de passagem da fase sólida no rúmen (JENKINS; PALMQUIST, 1982). Idealmente, sais de AG pré-formados não devem se dissociar no rúmen, mas devem dissociar-se completamente pós-ruminalmente, fazendo com que os AG fiquem disponíveis para absorção intestinal (JENKINS; PALMQUIST, 1984). O pH entre 2,0 e 2,5 no início do duodeno é capaz de induzir dissociação da quase totalidade dos sais de AG que chegam ao intestino (JENKINS; PALMQUIST, 1984).

Dessa forma, podemos ter dois mecanismos principais pelo qual a suplementação de MgO pode aumentar a gordura do leite. O primeiro seria um mecanismo predominante nas dietas com alto poder acidogênico, seja por ter baixa relação entre forragens e concentrados ou alto teor de amido de alta degradação ruminal. Nessa situação esperasse que aumento no pH do rúmen induzido por MgO reduza o acúmulo e a absorção de intermediários da biohidrogenação de lípidos insaturados, principalmente C18:2, trans-10, cis-12, capaz de inibir a síntese mamária de lípidos de cadeia curta (SUKHIJA; PALMQUIST, 1990). A concentração de Mg^{2+} no rúmen tem correlação inversa ao pH ruminal. Entre valores de pH 5 e 7, o que normalmente é observado no rúmen, uma pequena alteração no pH pode afetar de maneira significativa a concentração de Mg^{2+} no fluido do rúmen (DALLEY *et al.*, 1997). O segundo mecanismo seria predominante em dietas com menor poder acidogênico, através da formação de sais de Mg e AG. O maior pH ruminal facilitaria a formação de sais de Mg no rúmen, fazendo com que os AG cheguem mais parecidos aos consumidos no intestino delgado para serem absorvidos.

A digestão de lípidos ocorre em um ambiente de duas fases, uma insolúvel, na qual os AG livres oriundos da lipólise ruminal e fosfolípidios estão presentes, e a outra, solúvel, que consiste nas micelas contendo os AG já dissolvidos (BAUCHART, 1993). A transferência dos AG livres da fase insolúvel para a solúvel ocorre de maneira gradativa, à medida que a digesta

flui ao longo do intestino. Para que ocorra esse processo de transferência é necessário que haja a participação dos sais biliares.

Em animais não ruminantes, o ácido de origem estomacal é rapidamente neutralizado e valor de pH próximo de 6,5, ideal para que ocorra a lipólise, é rapidamente atingido mesmo nas porções mais craniais do intestino delgado. Ao contrário, em ruminantes esses valores de pH são atingidos apenas nas porções terminais do jejuno (CHRISTIE, 1981). Mesmo com essa diferença, a absorção de AG pelos ruminantes é eficiente, isso se deve pelo menos em parte ao fato de que nesses animais praticamente nenhum triglicerídeo, a não ser que protegido da degradação ruminal, chega na forma esterificada no duodeno, graças a lipólise previa por ação dos microrganismos ruminais. Christie (1981) relatou que em carneiros, o tempo para o início da absorção de AG quando infundidos na forma de triglicerídeos foi mais demorado do que quando os AG foram infundidos na sua forma não esterificada.

A digestibilidade intestinal dos AG parece ser mais alta em ruminantes do que em animais monogástricos. Este fato parece ser atribuído à maior capacidade dos ácidos biliares e micela em solubilizar os AG e ao menor pH da digesta intestinal de ruminantes, o que se deve a uma menor concentração de bicarbonato de origem pancreática. O menor pH facilita a dissolução de sais de AG formados no rúmen, sejam eles de Ca ou Mg. O menor pH é benéfico para a absorção de AG (BAUCHART, 1993). Ruminantes também têm trânsito da digesta pelo duodeno mais lento e mais contínuo ao longo do dia quando comparado a monogástricos, o que pode auxiliar na absorção dos AG (CHRISTIE, 1981).

De Souza, Preseault e Lock (2018) avaliaram em 24 vacas em lactação o efeito do perfil de AG de dietas sem ou com 8,6% da MS de caroço de algodão. O caroço de algodão substituiu casca de soja na dieta. As fontes suplementares de AG foram incluídas em 1,5% da MS e forneceram: 1) PA (80% de C16:0), 2) PA+SA (40% de C16:0 + 40% de C18:0), 3) PA+OA (45% de C16:0 + 35% de C18:1, cis-9). A suplementação de PA+OA aumentou ($P < 0,05$) a digestibilidade dos AG totais (79,4 vs 68,2% do consumido), AG de 16 carbonos (79,1 vs 66,0% do consumido) e AG de 18 carbonos (79,7 vs 72,0% do consumido) comparativamente a PA+SA. O consumo de AG não diferiu: AG total foi 1,25 kg/d, AG de 16 carbonos foi 0,36 kg/d e AG de 18 carbonos foi 0,88 kg/d. Vacas alimentadas com PA+OA tiveram menor concentração (23,5 vs 24,5 g/100g de AG) e secreção (366 vs 396 g/d) de AG De novo do que PA+SA, sem diferença nos AG mistos (37,2 g/100g de AG e 574 g/d). A proporção na gordura de AG pré-formados aumentou (39,4 vs 37,3 g/100g de AG, $P < 0,05$) e a secreção tendeu a aumentar (600 vs 570 g/d, $P < 0,10$) com o fornecimento de PA+OA em comparação a PA+SA.

A proporção e secreção de C16:0 (35,6 g/100g de AG e 550g/d) e de C18:0 (8,71 g/100g de AG e 134 g/d) não diferiram entre PA+OA e PA+SA. Entretanto, houve aumento na proporção (19,6 vs 17,6 g/100g de AG) e na secreção (297 vs 270 g/d) de C18:1, cis-9 com PA+OA relativo a PA+SA. Esses achados suportam a ideia de que o perfil de AG que chega ao intestino afeta a digestibilidade de lípidos e o perfil da gordura no leite.

Em sua metanálise, Boerman *et al.* (2015) observaram queda linear na digestibilidade dos AG com o aumento do fluxo duodenal de C18:0. Explicações para essa queda na digestibilidade de AG com o aumento do fluxo de C18:0 pode ser uma limitação na secreção de lisolecitina, diminuindo o fluxo de AG para as micelas (BOERMAN *et al.*, 2015) e uma possível saturação dos locais de absorção no intestino (GLASSER *et al.*, 2008a). Embora o fluxo total de AG para o duodeno afete a digestibilidade dos AG (BOERMAN *et al.*, 2015), o perfil de AG que chegam ao duodeno é um fator crítico para a digestibilidade dos AG (DOREAU; CHILLIARD, 1997). Os AG insaturados apresentam maior digestibilidade comparados aos AG saturados (BOERMAN *et al.*, 2015) e podem aumentar a solubilidade dos AG saturados, facilitando a sua transferência para as micelas (FREEMAN, 1969) e a captura e re-esterificação nos enterócitos (OCKNER; PITTMAN; YAGER, 1972). Freeman (1969) relatou que C18:1, cis-9 pode ter efeito positivo sobre a digestibilidade do AG C18:0 por alterar a solubilidade da micela.

Kalscheur *et al.* (1997) avaliaram o efeito do fornecimento de 2% de uma mistura de BicNa e MgO (75:25) sobre a digestibilidade de lípidos em vacas leiteiras. Os autores relataram coeficientes de digestibilidade negativos para C18:0 no trato total independente do fornecimento dos aditivos neutralizantes, indicando que mais AG C 18:0 foi excretado através das fezes do que consumido. Entretanto, mesmo as vacas alimentadas com aditivos neutralizantes tendo maior biohidrogenação ruminal do AG C 18:2 ($P = 0,03$) e AG C 18:3 ($P = 0,07$), indicando maior formação ruminal de C18:0, tiveram menor digestibilidade de C18:0 em termos absolutos (valores menos negativos), sugerindo que uma maior quantidade (g/d) de C18:0 foi absorvida, uma vez que o fluxo fecal de C18:0 foi similar entre os tratamentos. Resultados que indicam um melhor ambiente intestinal, favorecendo a absorção do AG C 18:0.

A formação de sais de Mg no rúmen pode favorecer a digestibilidade de AG no intestino delgado por fornecer uma maior quantidade de AG insaturados e possivelmente melhorar o perfil de AG que chega no local de absorção. Outros mecanismos parecem explicar o aumento na gordura no leite com o fornecimento de MgO. Emery, Brown e Bell (1965) propuseram que o efeito positivo do MgO sobre a gordura do leite seria por maior remoção de acetato e

triglicerídeos da corrente sanguínea pela glândula mamária. Thivierge *et al.* (1998) observaram que a concentração de triglicerídeos na veia mamária foi menor em vacas consumindo dietas com 1,9% da MS de BicNa ou 0,5% da MS de MgO. A suplementação com MgO tendeu a aumentar a diferença arteriovenosa e aumentou a taxa de extração de triglicerídeos pela glândula mamária.

A síntese de lipídeos pela glândula mamária é dependente de AG de cadeia curta, média e longa (GLASSER *et al.*, 2008b). O suprimento insuficiente de AG de cadeia longa pela dieta poderia limitar a síntese de gordura no leite (GLASSER *et al.*, 2008b), induzindo aumento na proporção de AG De novo e mistos na gordura. Esses autores observaram que a proporção de AG de cadeia curta e média foi maior na gordura do leite quando a dieta supriu quantidade limitada de AG de cadeia longa. Entretanto, quando o fornecimento de AG de cadeia longa não é limitado pode haver competição com AG de cadeia curta pela esterificação com o glicerol durante a formação dos triglicerídeos no leite (HANSEN; KNUDSEN, 1987). O mecanismo competitivo, entre AG de cadeia curta e longa, durante a etapa de esterificação com o glicerol parece ser o maior determinante do perfil de AG da gordura no leite quando outros AG bioativos, pontes inibidores da síntese da lipogênese na glândula mamária, estão ausentes (Ex: C18:2, trans-10, cis-12 BAUMAN; HARVATINE; LOCK, 2011).

2.4 Digestibilidade de nutrientes no trato digestivo total

A degradação ruminal de carboidratos fibrosos é um atributo fisiológico do ruminante e que envolve a adesão de microrganismos, quebra de polímeros como celulose e hemicelulose, e formação de AGV, CO₂ e metano por respiração anaeróbica e fermentação (WEIMER, 1996). O baixo pH ruminal parece reduzir a digestão de fibra (MOULD; ØRSKOV, 1983), por reduzir a taxa fracional de degradação e por aumentar o tempo de colonização microbiana (Lag time) (GRANT; MERTENS, 1992). Além do mais, o baixo pH pode diminuir o crescimento microbiano (SHI; WEIMER, 1992), por aumentar o gasto energético com a manutenção (FIRKINS, 1996; SHI; WEIMER, 1992)

O fornecimento de agentes neutralizantes, BicNa e MgO, é uma alternativa plausível para controlar o pH ruminal (HUMER *et al.*, 2017). Dessa forma, em teoria podem aumentar a degradação dos carboidratos fibrosos. O fornecimento de 1% da MS de BicNa em uma dieta contendo 35% da MS de forragem, 15% da MS silagem de alfafa e 20% da MS de silagem de milho, tendeu a aumentar ($P < 0,10$) a digestibilidade da FDN no trato total (FIRKINS; EASTRIDGE; PALMQUIST, 1991). Erdman, Hemken e Bull (1982) avaliaram em dois experimentos, com dieta contendo 40% da MS de silagem de milho o efeito da inclusão de 1%

da MS BicNa ou 0,8% da MS MgO fornecidos de maneira separada ou conjunta sobre a digestibilidade de nutrientes no trato total. No primeiro experimento, BicNa e MgO aumentaram ($P < 0,05$) a digestibilidade da FDN e da fibra em detergente ácido (FDA), tanto quando foram fornecidos de maneira individual quanto em conjunta. No segundo experimento, os agentes neutralizantes melhoram a digestibilidade da FDN apenas quando fornecidos de maneira conjunta, e não afetaram a digestibilidade da FDA.

Erdman (1988) demonstrou em metanálise que o fornecimento de BicNa foi efetivo em aumentar a digestibilidade da FDN e da FDA, entretanto, apenas em dietas contendo mais de 30% da MS de forragem e sendo a forragem silagem de milho. Entretanto, a adição de BicNa não foi efetivo em aumentar o pH ruminal médio dessas dietas, sugerindo que outros fatores além do pH ruminal podem interferir na resposta dos agentes neutralizantes sobre a digestibilidade da fibra. A adição de BicNa não aumentou a digestibilidade da FDN e FDA quando a forragem ofertada foi silagem de gramínea, pré secado ou feno de alfafa (ERDMAN, 1988).

Mouriño, Akkarawongsa e Weimer (2001) avaliaram no primeiro experimento o efeito do pH ruminal inicial (5,3, 5,7, 6,1, 6,5, 6,7) sobre a taxa fracional de degradação da celulose *in vitro*. A máxima taxa de degradação da celulose, medida pela produção de gás, foi atingida quando o pH inicial foi ao redor de 6,5, e caiu de forma linear com maior redução do pH inicial. Não foi observado uma produção líquida de gás quando o pH inicial foi de 5,3, indicando que não houve degradação da celulose. No segundo experimento os autores avaliaram o efeito do pH ruminal inicial (6,02, 6,56, 6,86) sobre a taxa fracional de degradação da celulose em diferentes concentrações de inoculo ruminal. Quedas de até 1,5 unidades ocorreram para o valor de pH durante o processo de fermentação, entretanto a taxa fracional de degradação da celulose se manteve constante ao longo do processo de fermentação. No quarto experimento os autores avaliaram o efeito do pH inicial (5,5, 6,0, 6,5, 6,6, 6,7) sobre a adesão microbiana a celulose. O pH inicial de 5,5 reduziu a adesão microbiana comparativamente aos valores de pH iniciais acima de 6,0, indicando a importância do pH inicial em que se inicia o processo fermentativo sobre a adesão microbiana e consequente degradação da fibra.

Conforme já discutido, a suplementação de ruminantes com aditivos neutralizantes, BicNa e MgO, parece afetar o pH ruminal (CRUYWAGEN *et al.*, 2015; HU; MURPHY, 2005; RAZZAGHI *et al.*, 2021). Entretanto, parecem não afetar o pH no momento da primeira refeição (ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982; GALIP, 2006; ROGERS; DAVIS; CLARK, 1982; SNYDER; ROGERS; MULLER, 1983; WEST, *et al.*, 1987), possivelmente, não

melhorando a adesão de microrganismos à fibra e conseqüentemente sua degradação (MOURIÑO; AKKARAWONGSA; WEIMER, 2001). BicNa e MgO não foram efetivos em aumentar a digestibilidade da FDN e FDA no trato digestivo total (DOEPEL; HAYIRLI, 2011; KALSCHEUR *et al.*, 1997; KENNELLY; ROBINSON; KHORASANI, 1999; KHORASANI; KENNELLY, 2001; PÉREZ-RUCHEL; REPETTO; CAJARVILLE, 2014; QIU *et al.*, 2004; THOMAS *et al.*, 1984; WAGNER *et al.*, 1993). O fornecimento de 0,8% da MS de BicNa não alterou a digestibilidade da FDN em dietas de alta (48,8% da MS) e baixa (31,5% da MS) forragem, com ou sem a adição de subprodutos fibrosos (PEREIRA; ARMENTANO, 2000). O fornecimento de 1% da MS de BicNa não alterou a digestibilidade da FDN no trato total em dietas contendo 30% da MS forragem (FIRKINS; EASTRIDGE, 1992). Marden *et al.* (2008) relataram aumento da digestibilidade da FDA no trato digestivo total (24,4 vs 18,1%, $P < 0,05$) para vacas leiteiras consumindo BicNa. Entretanto, o fornecimento de 150 g de BicNa foi feito 1 vez ao dia em *top dress* à dieta basal.

O efeito de aditivos neutralizantes sobre a digestibilidade de carboidratos não fibrosos, principalmente amido, tem sido avaliado. Os dados sugerem que os agentes neutralizantes do rúmen, BicNa e MgO, podem aumentar a passagem da fase fluída do rúmen para o intestino (CHRISTIANSEN; WEBB, 1990; HARRISON *et al.*, 1975; ROGERS *et al.*, 1979; RUSSELL; CHOW, 1993), potencialmente capaz de aumentar do fluxo de amido do rúmen para o duodeno (BOERNER *et al.*, 1987; HARRISON *et al.*, 1975) ou não (CHRISTIANSEN; WEBB, (1990). Harrison *et al.* (1975), ao aumentarem a taxa de diluição da fase líquida do rúmen, através da infusão de tampões, observaram aumento do fluxo de amido não degradado pelo rúmen quando a fonte de amido era milho floculado. Boerner *et al.* (1987), demonstraram em novilhos que a adição de agentes neutralizantes pode reduzir a degradação ruminal do amido quando a fonte de amido foi milho moído. Christiansen e Webb (1990) observaram em novilhas angus, aumento do fluxo de líquido duodenal (71,3 vs 60,5 L/d, $P < 0,05$) com o fornecimento de 0,5% da MS de MgO e não observaram efeito sobre o fluxo de amido do rúmen para o duodeno, entretanto, a fonte de amido era milho inteiro a 80% da MS da dieta. Com base nesses experimentos, pode-se supor que o tipo de processamento da fonte de amido, o tamanho de partícula, ou o tipo do amido podem determinar o efeito de aditivos neutralizantes sobre a partição da digestão do amido entre rúmen e intestinos, mas não existe literatura que evidenciou este efeito. Como mostrado por Ewing, Johnson e Rumpler (1986) e de acordo com Allen (1997) é muito mais fácil que partículas finamente moídas saíam do rúmen suspensas através da fase líquida do que partículas grosseiras, ou mesmo inteiras.

Embora a partição de amido possa ser alterada com a utilização dos agentes neutralizantes, BicNa e MgO, entre rúmen e intestinos, a digestão do amido no trato total parece não ser afetada. O fornecimento de 1% da MS de BicNa para novilhos, independente do nível de inclusão de concentrado, 50 ou 90% da MS não afetou a digestibilidade do amido no trato total (BOERNER *et al.*, 1987). Em vacas leiteiras consumindo dietas de baixa forragem (31,5% da MS), contendo ou não 47% da MS de subprodutos fibrosos, e alta forragem (49% da MS) não foi observado o efeito da adição de 0,8% da MS de BicNa sobre a digestibilidade de glicose livre mais amido no trato digestivo total (PEREIRA; ARMENTANO, 2000). Não houve efeito da suplementação de vacas leiteiras com 1% da MS de BicNa, ou de três fontes de MgO a 0,5% da MS sobre a digestibilidade do amido no trato total (THOMAS *et al.*, 1984). Adição de MgO em 0,5% da MS não afetou a digestibilidade aparente do amido no trato total de novilhas angus em dietas contendo 80% da MS milho inteiro (CHRISTIANSEN; WEEB, 1990). Vacas leiteiras com o CMS de 26,5 kg/d e recebendo 200g/d de BicNa não tiveram a digestibilidade do amido no trato total alterada em comparação com animais controle (NEIDERFER *et al.*, 2020). Erdman *et al.* (1988) reportaram através de uma metanálise que a adição de BicNa parece não afetar a digestibilidade do amido no trato total de vacas leiteiras.

Apesar da grande parte da literatura reportar que não há efeito dos agentes neutralizantes, BicNa e MgO, sobre a digestibilidade do amido no trato total, existem trabalhos em que se observou redução na digestibilidade do amido no trato total (ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982). No primeiro experimento os autores observaram queda na digestibilidade do amido no trato total com 1% da MS de BicNa na dieta (93,1 vs 95,8% do ingerido, $P < 0,05$), mas este efeito não foi observado no segundo experimento. Adição de 0,8% da MS de MgO não afetou a digestibilidade do amido no trato total, mesmo quando fornecido em conjunto com 1% da MS BicNa em ambos os experimentos. Explicações não foram dadas pelos autores (ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982) com relação a diferença de resposta com relação a inclusão de 1% da MS de BicNa no experimento 1 e 2. Redução na digestibilidade do amido no trato total de vacas leiteiras ocorreu com a inclusão de 1,2% da MS de BicNa em uma dieta contendo 40% da MS de forragem (ROGERS *et al.*, 1985). Há trabalhos em que se observou aumento na digestibilidade de amido no trato total. Em vacas leiteiras, a adição de 2% da MS de BicNa em uma dieta rica em amido (51,8% da MS) tendeu a aumentar ($P < 0,10$) a digestibilidade do amido no trato total (ROGERS; DAVIS; CLARK, 1982).

Oba e Allen (2003) avaliaram, em um arranjo fatorial 2 x 2 o efeito do teor e fonte de amido sobre a partição da digestão do amido. Oito vacas com cânulas ruminais e duodenais,

receberam dietas contendo baixo (21% da MS), ou alto (32% da MS) amido e a fonte de amido era grão úmido de milho ensilado ou milho moído seco. O consumo de milho moído seco diminuiu a quantidade (kg/d) e a proporção (% do consumido) do amido degradado no rúmen e aumentou a quantidade (kg/d) e a proporção (% do consumido, e % do que chegou ao duodeno) da digestão do amido que ocorreu nos intestinos. Os autores (OBA; ALLEN, 2003) não reportaram diferença na digestão do amido no trato total (% do consumido) em animais consumindo milho moído seco ou grão úmido de milho ensilado, indicando um efeito compensatório pelo intestino delgado sobre a digestão de amido. Os autores demonstraram uma correlação positiva e forte ($r^2 = 0,99$, $P < 0,01$) entre o fluxo duodenal de amido (kg/d) e a quantidade de amido digerido (kg/d) nos intestinos. Mills, France e Dijkstra (1999) mostraram que a digestão pós ruminal de amido (g/d) é diretamente proporcional ao consumo diário e passagem de amido do rúmen para o duodeno, mas a digestão do amido no trato total varia pouco devido à compensação da menor digestão ruminal pela digestão intestinal.

Trabalhos na literatura suportam que o baixo pH intestinal pode reduzir a digestão intestinal do amido por diminuir a atividade da amilase pancreática (RUSSELL; YOUNG; JORGENSEN, 1981; WHEELER; NOLLER, 1977). O pH ideal para a ação da amilase pancreática parece ser de 6,9 e para a maltase intestinal de 5,8 (RUSSELL; YOUNG; JORGENSEN, 1981). Poucos trabalhos na literatura avaliaram o efeito dos agentes neutralizantes, BicNa e MgO, sobre o pH do intestino delgado. Christiansen e Weeb (1990), avaliaram em novilhas angus com cânulas no duodeno e íleo a inclusão de 0,5% da MS de MgO. MgO não aumentou o pH duodenal, mas, elevou o pH ileal comparativamente aos animais controle. O pH fecal parece estar relacionado positivamente com o pH do intestino delgado (CHRISTIANSEN; WEEB, 1990; WHEELER; NOLLER, 1977). Entretanto, a suplementação de BicNa parece não afetar o pH fecal (ERDMAN *et al.*, 1980; ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982; ESCOBOSA *et al.*, 1984; KILMER; MULLER; WANGSNESS, 1980; NEIDERFER *et al.*, 2020; RUSSELL; YOUNG; JORGENSEN, 1980; THOMAS *et al.*, 1984), mas a suplementação de MgO parece aumentar de maneira consistente (ERDMAN *et al.*, 1980; ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982; SCHAEFER *et al.*, 1982; TEH; HEMKEN; HARMON, 1985; THOMAS *et al.*, 1984), sugerindo que a suplementação de MgO, mas não de BicNa, pode suportar maiores digestibilidades intestinais de amido.

2.5 Perfil de fermentação ruminal

Os AGV produzidos no rúmen pela fermentação microbiana são a maior fonte de energia para os ruminantes (BERGMAN, 1990). O perfil fermentativo do rúmen varia de

acordo com o substrato disponível e o metabolismo sistêmico de cada AGV difere (MORVAY *et al.*, 2011). A proporção molar entre os AGV é definida pela rota metabólica do microrganismo envolvido da degradação de determinado substrato (RUSSELL, 2002) e pela taxa de produção, interconversão, e remoção de AGV por absorção pela parede ou passagem com a fase fluída para o omaso (BANNINK *et al.*, 1997). Em bovinos adultos, apesar da área de superfície absorptiva do ruminoretículo ser maior em termos absolutos (m^2) que a do omaso, a área absorptiva do omaso por quilograma de digesta foi maior que a do ruminoretículo em 83%, demonstrando a importância fisiológica do omaso para a taxa de remoção de AGV (DANIEL; RESENDE JÚNIOR; CRUZ, 2006) .

O efeito de aditivos neutralizantes sobre o perfil de AGV no rúmen tem sido bastante estudado. Hu e Murphy (2005) relatam que a resposta ao fornecimento de BicNa sobre o perfil de AGV no rúmen parece depender da dieta basal. As dietas foram categorizadas como: 1) MS, quando as dietas tinham como fonte de fonte de forragem, unicamente ou majoritariamente silagem de milho. 2) NMS, quando as dietas tinham outras forragens, sem ter silagem de milho como forragem única ou porção majoritária da forragem na dieta. O BicNa, seja em inclusão moderada (0,7-1,0% da MS) ou alta (1,0-1,5% da MS) somente afetou a proporção molar de propionato e a relação entre acetato e propionato quando incluído em dietas MS. Na dieta MS, o fornecimento de BicNa reduziu ($P = 0,04$) a proporção molar de propionato em 2,4 mol/100 mol e aumentou ($P = 0,04$) a relação entre acetato e propionato em 0,26 unidades comparativamente a dietas sem BicNa. As dietas MS tinham menor teor de fibra que as dietas NMS.

O efeito da inclusão de 1,2% de BicNa em vacas em final de lactação, 240 ± 18 dias em lactação (DEL), foi avaliado em dietas com alta (75% da MS) ou média (50% da MS) inclusão de concentrado (KHORASANI; KENNELLY, 2001). As concentrações ruminais de acetato e butirato aumentaram com o fornecimento de BicNa, mas o aumento foi mais expressivo na dieta contendo maior teor de concentrado ($P < 0,01$). A suplementação de BicNa reduziu ($P = 0,01$) a concentração de propionato no fluído do rúmen apenas na dieta de alto concentrado, aumentando a relação entre acetato e propionato. Kennelly, Robinson e Khorasani (1999) avaliaram em vacas de começo de lactação (100 ± 20 DEL) a adição de 1,2% de BicNa em dietas de média (50% da MS) e alta (75% da MS) inclusão de concentrado. A inclusão de BicNa aumentou ($P < 0,01$) a concentração de acetato no rúmen principalmente na dieta de alto concentrado e reduziu a concentração de propionato apenas nesta dieta ($P < 0,01$), aumentando a relação entre acetato e propionato.

Apesar da suplementação de aditivos neutralizantes ser mais efetiva em alterar o perfil de AGV no rúmen em dietas contendo alto teor de concentrados, o tipo de processamento da fonte de amido parece interferir na resposta. Haaland e Tyrrell (1982) avaliaram o efeito de 2% da MS de BicNa em novilhos angus e vacas Holandesas não-lactantes, consumindo dieta contendo 55% de milho processado grosseiramente e inteiro. A fonte de forragem era silagem de milho com uma inclusão de 35% na MS. Inclusão de BicNa não afetou a proporção molar de acetato (62,8 mol/100 mol de AGV). Entretanto, diferentemente do esperado, aumentou a proporção molar de propionato (21,0 vs 19,2 mol/100 mol, $P < 0,05$), induzindo queda na relação entre acetato e propionato (3,03 vs 3,41, $P < 0,05$). Dietas contendo alto teor de amido normalmente aumentam a proporção molar de propionato (CASTRO *et al.*, 2009), mas os agentes neutralizantes podem alterar o local de digestão do amido, reduzindo a quantidade de amido degradado no rúmen e aumentando a sua digestão pós ruminal (RUSSELL; CHOW, 1993).

Na metanálise de Hu e Murphy (2005) foi detectado aumento apenas numérico na proporção molar de acetado em resposta a BicNa. Entretanto, outros trabalhos têm observado aumento na proporção molar de acetado em resposta a BicNa e MgO (EMERY; BROWN; THOMAS, 1964; QIU *et al.*, 2004; RAZZAGHI *et al.*, 2021; STAPLES *et al.*, 1988). O aumento da proporção molar de acetato, muitas vezes vêm acompanhado de redução da proporção molar de propionato, induzindo aumento da relação entre acetato e propionato no rúmen (CRUYWAGEN *et al.*, 2015; ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982; KAPLAN *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos na literatura não detectaram efeito de aditivos neutralizantes, BicNa e MgO, sobre a proporção molar de acetato e propionato e sobre a relação entre acetato e propionato. Alguns pontos devem ser avaliados nesses trabalhos. Harrison, Riley e Loney (1989) forneceram 1,2% da MS de BicNa em dieta com 40% da MS de silagem de gramínea, o que resultou em alto teor de FDN na dieta (42,3% da MS). Arambel *et al.* (1988) avaliaram 0,8% de BicNa, 0,4% de MgO ou a ação conjunta dos dois aditivos neutralizantes em dieta com alta inclusão de feno de alfafa (36% da MS), resultando em um alto teor de fibra (28,0% de FDA). Doepel e Hayirly (2011) avaliaram 0,75% da MS de BicNa em dieta com 50% de forragem (30% de feno de alfafa e 70% de silagem de cevada), o que resultou em teores de FDN de 33,6% da MS. Demonstrando que normalmente não há efeito da adição de BicNa e MgO sobre o perfil de AGV no rúmen quando em dietas de alta forragem ou baixo poder acidogênico.

Parece não haver consenso sobre o efeito de aditivos neutralizantes sobre a proporção molar de butirato no rúmen. A suplementação com aditivos neutralizantes, BicNa e MgO, parece não afetar (ARAMBEL *et al.*, 1988; DOEPEL; HAYIRLI, 2011; ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982; HARRISON; RILEY; LONEY, 1989; KALSCHEUR *et al.*, 1997; KAPLAN *et al.*, 2010; RAZZAGHI *et al.*, 2021) ou aumentar (CRUYWAGEN *et al.*, 2015; EMERY; BROWN; THOMAS, 1964; QIU *et al.*, 2004) a proporção molar de butirato no fluido ruminal. Entretanto, o padrão de resposta parece não ser tão evidente quanto para as proporções molares de acetato e propionato. A suplementação de vacas Holandesas em lactação com 0,8% da MS de BicNa ou 0,4% da MS de MgO em uma dieta de 43% da MS de forragem não alterou as proporções molares de butirato (ARAMBEL *et al.*, 1988). A proporção molar de butirato não foi afetada, em vacas em lactação, pela inclusão de 0,75% da MS de BicNa em uma dieta de 50% da MS de forragem (DOEPEL; HAYIRLI, 2011). Em uma dieta de 40% da MS de forragem para vacas em lactação, o fornecimento de 1% da MS de BicNa ou 0,8% da MS de MgO, fornecidos de maneira individual ou conjunta, não afetou a proporção molar de butirato (ERDMAN; HEMKEM; BULL, 1982). A proporção molar de butirato em vacas em lactação não foi alterada pela adição de 1,2% da MS de BicNa em dietas contendo 40% da MS de silagem de gramínea (HARRISON; RILEY; LONEY, 1989). O fornecimento, para vacas em lactação, de 2% da MS de uma mistura (75:25) contendo BicNa e MgO não alterou as proporções molares de butirato em dietas contendo alto (60% da MS) ou baixo (25% da MS) teor de forragem (KALSCHEUR *et al.*, 1997). Em uma dieta contendo 40% da MS de forragem a adição de 0,8% de BicNa ou 0,4% de MgO, de maneira individual ou conjunta, não alterou as proporções molares de butirato em vacas em lactação (RAZZAGHI *et al.*, 2021). Entretanto, a adição de 0,8% de BicNa em dietas de vacas em lactação, aumentou a concentração ruminal de butirato em comparação com controle (20,3 vs 17,7 mM, $P < 0,05$) (CRUYWAGEN *et al.*, 2015). Emery, Brown e Thomas (1964) reportaram aumento na proporção molar de butirato (16,1 vs 11,5 mol/100 mol, $P < 0,05$), em vacas em lactação, consumindo 450 g/d de BicNa em uma dieta restrita a apenas 0,9 kg de MS/d de feno e concentrado *ad libitum*. Em uma dieta para vacas em lactação, contendo 36% da MS de forragem, a adição de 0,8% de BicNa aumentou (13,9 vs 11,7 mol/100 mol, $P < 0,05$) a proporção molar de butirato (QIU *et al.*, 2004).

Menores quantidades de trabalhos têm avaliado o efeito dos aditivos neutralizantes, BicNa e MgO, sobre a proporção molar de AGV de cadeia ramificada, 2-metil-butilato, isovalerato, isobutilato e valerato, produtos da deaminação dos aminoácidos isoleucina, leucina, valina e prolina, respectivamente (APAJALAHTI *et al.*, 2019). A concentração de

isoácidos no rúmen pode refletir a degradação da proteína dietética no rúmen. Parece existir uma correlação positiva entre pH ruminal e a deaminação de aminoácidos (LANA; RUSSELL; VAN AMBURGH, 1988). Alguns autores relatam que a proporção molar de AGV de cadeia ramificada não é afetada por BicNa e MgO (ARAMBEL *et al.*, 1988; DOEPEL; HAYIRLI, 2011; RAZZAGHI *et al.*, 2021). Entretanto, Kalscheur *et al.* (1997) não observaram, em vacas em lactação, alterações nas proporções molares de isobutirato (0,69 mol/100 mol de AGV) e valerato (1,76 mol/100 mol de AGV) com o fornecimento de uma mistura de 1,5% de BicNa e 0,5% de MgO na MS, mas a proporção molar de isovalerato tendeu a aumentar como a suplementação de aditivos neutralizantes (1,59 vs 1,34 mol/100 mol de AGV, $P = 0,09$). Qiu *et al.* (2004) não detectaram efeito, em vacas em lactação, de 0,8% da MS de BicNa sobre a proporção molar de isovalerato (1,67 mol/100 mol de AGV), mas houve redução na proporção molar de valerato (1,33 vs 1,56 mol/100 mol de AGV, $P < 0,05$) e aumento de isobutirato (1,17 vs 0,95 mol/100 mol, $P < 0,05$). Staples *et al.* (1988) observaram, em vacas em lactação, aumento nas proporções molares de isobutirato (1,2 vs 0,9 mol/100 mol, $P < 0,01$) e isovalerato (0,9 vs 0,6 mol/100 mol, $P < 0,01$) com suplementação de 1% de BicNa. A suplementação de 1,2% da MS de BicNa elevou ($P \leq 0,05$), em vacas em lactação, as concentrações ruminiais de valerato (1,70 vs 1,59 mM) e isovalerato (1,56 vs 1,49 mM), mas não afetou a concentração de isobutirato (0,93 mM) (KHORASANI; KENNELLY, 2001). A suplementação de 1,2% da MS de BicNa aumentou ($P \leq 0,03$), em vacas em lactação, as concentrações de isobutirato, valerato e isovalerato no fluido do rúmen, entretanto o aumento foi mais significativo em dieta com maior teor de concentrado do que em baixo concentrado (KENNELLY; ROBINSON; KHORASANI, 1999).

2.6 pH do rúmen e do trato digestivo

O acúmulo ruminal de AGV, sem o adequado tamponamento, pode reduzir o pH do fluido e ter efeitos prejudiciais sobre a motilidade (CRICHLLOW; LEEK, 1986) e anatomia (ASCHENBACH *et al.*, 2019; GAEBEL; BELL; MARTENS, 1989) ruminal, digestão de fibra (GRANT; MERTENS, 1992), produção microbiana (HOOVER, 1986), produtividade (KALSCHOUR *et al.*, 1997; KRAUSE; OETZEL, 2005), consumo (NOCEK, 1997), e saúde (PLAIZIER *et al.*, 2008) de vacas leiteiras, e pode afetar o comportamento ingestivo (DeVRIES *et al.*, 2009). Acidose ruminal subaguda é um fator importante sobre o bem estar animal e lucratividade por estar relacionada com o desempenho lactacional e a taxa de descarte do rebanho (KLEEN *et al.*, 2003).

Os AGV produzidos no rúmen são removidos do ambiente ruminal por passagem com a fase líquida e absorção pela parede do omaso ou por absorção pela parede do rúmen. A concentração de AGV no rúmen varia de 60 e 150 mM e tem grande variação ao longo dia (BERGMAN, 1990). Vacas de leite de alta produção podem produzir até 160 moles de AGV por dia (RUSSELL, 2002). Peters, Shen e Robinson (1992) demonstraram em novilhos de corte alimentados a nível de manutenção a importância da absorção de AGV pela parede do rúmen e da passagem para o omaso. Cerca de 87% do acetato produzido ou infundido desapareceu do retículo rúmen por absorção pela parede e cerca de 13% desapareceu por passagem para o omaso. Entretanto, quando a quantidade de acetato infundido foi aumentada a taxa fracional de absorção pela parede ruminal passou a ser em média de 64%, demonstrando a importância do processo de absorção de AGV pela parede ruminal, além desses autores ressaltarem a importância de órgãos como o omaso, para a absorção de AGV. Em bovinos adultos, apesar da área de superfície absorptiva do ruminoretículo ser maior em termos absolutos (m^2) que a do omaso, a área absorptiva do omaso por quilograma de digesta foi maior que a do ruminoretículo em 83% (DANIEL; RESENDE JÚNIOR; CRUZ, 2006). Daniel e Resende Júnior (2012) demonstraram, *in vitro*, que a taxa de absorção de AGV por cm^2 no omaso foi 11 vezes maior que no rúmen, demonstrando a importância fisiológica do omaso para a taxa de remoção de AGV.

A absorção de AGV pelo epitélio pode ocorrer para a forma protonada ou não-protonada (DIJKSTRA *et al.*, 2012). A absorção da forma protonada (não-dissociada) ocorre por difusão por gradiente de concentração devido à natureza lipofílica e sem carga na molécula. A absorção do AGV dissociado depende de íons bicarbonato e vários transportadores (ASCHENBACH *et al.*, 2011). Além da absorção de AGV, os mecanismos que mantêm o pH intracelular das células epiteliais próximos a neutralidade são extremamente importantes (GABEL; ASCHENBACH; MULLER, 2002).

A absorção de AGV de maneira não dissociada é um processo passivo, ou seja, sem gasto de energia e contribui positivamente para o controle do pH do rúmen, uma vez que um próton é removido juntamente com o AGV. Entretanto, como o pH do rúmen é normalmente maior que o pK_a dos AGV, a grande maioria dos AGV se encontra em forma dissociada. Dessa forma, o mecanismo de contratransporte realizado por meio de proteínas apicais de Na^+/H^+ torna-se importante (GABEL; ASCHENBACH; MULLER, 2002). Os prótons que entram no rúmen juntamente com a saída de íons de Na^+ parecem criar um microambiente próximo ao epitélio ruminal capaz de protonar os AGV. Esse contratransporte é estimulado pelo aumento

das concentrações ruminais de Na^+ e pela absorção de AGV na forma protonada (DIJKSTRA *et al.*, 2012).

A absorção de AGV na sua forma dissociada é um processo ativo, ou seja, há gasto de energia, necessitando de proteínas transportadoras. Uma vez que o ânion do ácido é absorvido, é necessário para a manutenção do equilíbrio de cargas, que haja a absorção de cátions ou o retorno de outros ânions para o rúmen. A principal forma de absorção dos AGV na sua forma dissociada é através do contratransporte de bicarbonato (GABEL; ASCHENBACH; MULLER, 2002) e parece ocorrer na relação de dois AGV para um íon bicarbonato (BERGMAN, 1990). Podemos dizer que a parede ruminal é uma importante fonte de bicarbonato, que por sua vez pode ser oriundo do sangue ou ser formado *De novo* dentro das células do epitélio ruminal através da conversão de CO_2 em bicarbonato pela ação da enzima citoplasmática anidrase carbônica (GABEL; ASCHENBACH; MULLER, 2002). Vale ressaltar a importância da secreção de bicarbonato no rúmen para o controle do pH ruminal, seja esse bicarbonato oriundo da saliva ou oriundo diretamente da parede ruminal durante o processo de absorção dos AGV. O bicarbonato oriundo da saliva parece ser metade ou menos do que o bicarbonato que entra através da parede ruminal (DIJKSTRA *et al.*, 2012).

O modo de ação que o sistema bicarbonato age para causar tamponamento ruminal é mais complexo do que outros sistemas tampões, uma vez que não é dependente apenas do equilíbrio com a sua forma protonada (ácido carbônico, H_2CO_3) cujo pK_a é 3,80 (KOHN; DUNLAP, 1998). O ácido carbônico também está em equilíbrio com a água e o gás carbônico dissolvidos. A concentração de CO_2 em meio aquoso é determinado pela pressão parcial do CO_2 na fase gasosa e pela constante de Henry. A remoção de CO_2 da fase gasosa pode se dar por eructação ou difusão pela parede ruminal, o que por sua vez diminuirá a sua pressão parcial, fará com que haja uma menor quantidade de CO_2 solúvel, facilitando a ação do sistema de tamponamento do bicarbonato, uma vez que a reação se deslocará mais para a formação de ácido carbônico e conseqüentemente CO_2 e água (KOHN; DUNLAP, 1998).

A absorção dos AGV também ocorre por transporte ativo da forma dissociada envolvendo gasto energético e mediado por proteínas, mas independente de bicarbonato (ASCHENBACH *et al.*, 2009). Esse processo parece não ser tão benéfico com relação a absorção de prótons e no controle do pH ruminal uma vez que o ânion do ácido, que por sua vez pode ser considerada uma base, e que de certa maneira poderia exercer tamponamento é absorvido. Somado a isso, o próton do ânion do AGV absorvido continua presente no ambiente ruminal, contribuindo para a redução do pH.

A suplementação de aditivos neutralizantes pode ser utilizada como estratégia para controle do pH ruminal (HUMER *et al.*, 2017). BicNa e MgO podem auxiliar na absorção de AGV. O BicNa pode aumentar o aporte de Na para o ambiente ruminal e estimular o contratransporte de Na^+/H^+ (DIJKSTRA *et al.*, 2012), favorecendo um microambiente mais ácido próximo a parede ruminal, aumentando a doação de prótons para os AGV dissociados e consequentemente a sua taxa de absorção pela parede ruminal por difusão. Outro possível benefício na utilização de MgO e BicNa, é que esses compostos podem fornecer um maior aporte de cátions para o rúmen e conforme abordado anteriormente, quando o ânion do ácido é absorvido, para manter o equilíbrio de cargas é necessário que haja maior absorção de cátions ou uma maior excreção de ânions para dentro do rúmen. Dessa forma, os agentes neutralizantes podem aumentar a quantidade de cátions disponíveis para a absorção através da parede ruminal quando os ânions dos AGV forem absorvidos.

A suplementação de cátions, através do aumento do DCAD da dieta pode elevar as concentrações de íons bicarbonato e a pressão parcial de CO_2 no sangue (HU; MURPHY, 2004). O aumento desses compostos pode suportar maiores absorções de AGV pela parede ruminal através do mecanismo dependente de bicarbonato. Maiores quantidades de bicarbonato, seja de maneira direta, ou indireta, através da conversão de CO_2 pela enzima anidrase carbônica estaria disponível para ser transportado para dentro do rúmen favorecendo a absorção de AGV na forma dissociada.

Embora o pH ruminal seja uma variável de extrema importância ao se avaliar a efetividade de um agente neutralizante, parece não existir um consenso na literatura com relação a maneira correta de se fazer isso. O ambiente ruminal é algo dinâmico e que apresenta um padrão de fermentação circadiano. Dessa forma, não pode ser resumido apenas através do valor médio do pH durante determinado período de tempo, normalmente /dia. Outras variáveis, como o tempo de pH abaixo de 5,6 ou 5,8, pH mínimo, pH máximo, além de medidas de variação do pH diário (PEREIRA *et al.*, 1999; RAZZAGHI *et al.*, 2021) precisam ser exploradas para auxiliar na compreensão do modo de ação dos aditivos neutralizantes sobre o pH ruminal.

Inúmeros trabalhos na literatura, avaliando aditivos neutralizantes relatam apenas o pH ruminal médio ou o valor pontual do pH ruminal obtido ao longo do dia (ERDMAN *et al.*, 1980; ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982; KALSCHUR *et al.*, 1997; KAPLAN *et al.*, 2010; KENNELLY; ROBINSON; KHORASANI, 1999; KHORASANI; KENNELLY, 2001; MARDEN *et al.*, 2008; PÉREZ-RUCHEL; REPETTO; CAJARVILLE, 2014; THOMAS *et al.*, 1984), mesmo quando o pH ruminal foi mensurado durante diversas vezes ao dia (DOEPEL;

HAYIRLI, 2011; KENNELLY; ROBINSON; KHORASANI, 1999; KHORASANI; KENNELLY, 2001; PÉREZ-RUCHEL; REPETTO; CAJARVILLE, 2014). O que pode explicar, pelo menos em parte, a falta de efeito dos agentes neutralizantes sobre o pH ruminal em alguns trabalhos. Cruywagen *et al.* (2015) mensuraram o pH ruminal através de probes (WTW 340i, Merck), durante 24 horas em intervalos de 10 minutos. Os autores não observaram efeito da adição de 0,8% de BicNa sobre o pH ruminal médio (5,58), e nem sobre o pH máximo (6,09). Entretanto, BicNa aumentou o pH mínimo (5,37 vs 5,19, $P < 0,05$) e reduziu o tempo de pH $< 5,5$ (7,5 vs 13,8 horas, $P < 0,05$). Razzaghi *et al.* (2021) avaliaram o efeito da inclusão de 0,8% de BicNa ou 0,4% de MgO e não observaram efeito dos aditivos neutralizantes sobre o pH médio diário (5,78) mensurado a cada 10 minutos. Ambos aditivos neutralizantes aumentaram ($P < 0,05$) o pH máximo (6,05, 6,28, 6,22, controle, BicNa, MgO, respectivamente) e MgO elevou o valor de pH mínimo atingido comparativamente ao controle (5,11 vs 5,46, $P < 0,05$) e ambos agentes neutralizantes reduziram ($P < 0,05$) o tempo de pH $\leq 5,8$ (12,5, 5,8, 8,7, controle, BicNa, MgO, respectivamente).

O horário de coleta das amostras para a avaliação do pH ruminal parece interferir na resposta. Inclusão de 0,9% de BicNa tendeu a aumentar o pH médio diário, com mensurações feitas a cada 10 minutos, em comparação aos animais não recebendo agentes neutralizantes (5,92 vs 6,15, $P < 0,10$) e reduziu o tempo de pH $\leq 5,5$ (6,10 vs 3,17 horas, $P < 0,05$) (NEVILLE *et al.*, 2019). Entretanto, quando o pH ruminal foi avaliado pela média de intervalos a cada duas horas, a partir da hora dois até a hora doze após a refeição, BicNa aumentou o pH médio da hora dois a quatro (5,78 vs 6,14, $P < 0,05$) após a refeição, mas não afetou os demais intervalos (4-6, 6-8, 8-10, 10-12) comparativamente ao controle. Galip (2006) demonstraram em carneiros que o fornecimento de 10 gramas/d de BicNa foi eficiente em aumentar o pH ruminal apenas na hora três (5,3 vs 5,8, $P < 0,10$) e seis (5,6 vs 6,0, $P < 0,05$) após a refeição, mas não, antes do fornecimento da mesma (7,1). Kennelly, Robinson e Khorasani (1999) observaram que o pH ruminal noturno foi mais baixo para animais consumindo 1,2% de BicNa em dietas de baixa forragem (25% da MS) do que animais controle. De acordo com o exposto, diferentes explicações podem ser dadas. Uma delas seria que BicNa teria a capacidade de alterar o padrão ingestivo, conseqüentemente, o padrão fermentativo. A outra, seria que BicNa não apresenta uma capacidade tamponante igualmente eficiente ao longo dia, algo que pode ser explicado pela alta solubilidade (GOFF, 2018) e possível maior tamponamento nas primeiras horas após a ingestão. Mistura de MgO, com diferentes cinéticas de solubilização ruminal, visando uma

ação rápida e duradoura têm sido testados como uma maneira de melhorar o ambiente ruminal ao longo de todo dia (BACH *et al.*, 2018).

Apesar do pH ruminal médio, ou o valor pontual em determinada hora após a refeição não serem muitas vezes adequados para avaliar a efetividade dos agentes neutralizantes, Hu e Murphy (2005) em sua revisão de literatura mostraram que BicNa, independente de seu nível de inclusão, moderado (0,7-1,0% da MS) ou alto (1,0-1,5% da MS), aumentou ($P = 0,01$) o pH ruminal em 0,13 unidades em comparação a animais controle. Entretanto, esse aumento foi observado apenas para dietas que continham silagem de milho como única ou porção majoritária da forragem da dieta. Nível de fibra da dieta e tipo de forragem foram confundidos no experimento, sendo dietas à base de silagem de milho as dietas com menores teores de fibra. Kalscheur *et al.* (1997) reportaram que o fornecimento de 2% da MS de uma mistura na proporção de 75:25 para BicNa e MgO, respectivamente tendeu a ser mais eficiente em elevar o pH ruminal ($P = 0,07$) quando animais estavam recebendo uma dieta de baixa forragem (40% da MS). Através de uma revisão de literatura, Erdman (1988), dividiram as dietas de acordo com o teor de forragem. Dietas foram classificadas como baixa forragem quando continham menos que 30% de forragem na MS da dieta e como alta forragem quando continham mais que 30% da MS. BicNa e MgO elevaram ($P < 0,05$) o pH ruminal em 0,26 e 0,15 unidades percentuais, respectivamente, entretanto, apenas quando incluídos em dietas de baixa forragem.

Bach *et al.* (2018) avaliaram o efeito do fornecimento de 0,8% da MS de BicNa e 0,4% da MS de MgO. Os animais receberam durante a primeira semana uma dieta de relação forragem concentrado de 39:61 na MS e tiveram um incremento de 1 kg por semana de grão de cevada na dieta em substituição a forragem até receberem 3 kg de cevada adicional durante a quarta semana experimental. Animais recebendo BicNa e controle tiveram uma queda no pH ruminal médio diário quando desafiados com 3 kg de cevada, entretanto, animais recebendo MgO não. Na quarta semana, quando os animais foram desafiados com 3 kg de cevada, animais recebendo MgO tiveram maior ($P < 0,05$) pH médio comparativamente aos animais controle, não diferindo do tratamento contendo BicNa, além, de apresentarem menor tempo de $\text{pH} \leq 5,8$ comparativamente aos animais controle e BicNa ($P < 0,05$).

Dados na literatura têm mostrado que a ação dos agentes neutralizantes pode não se dar apenas no ambiente ruminal, mas também, quando se tratando do fornecimento de MgO, das diversas partes do trato gastrointestinal. Christiansen e Webb (1990), avaliaram em novilhas com cânulas no duodeno e íleo o efeito da adição de 0,5% da MS de MgO sobre o pH em diferentes porções do trato gastrointestinal. Os autores observaram que o pH nas porções

craniais do duodeno não foram afetadas, apresentando valores de pH médio de 2,55. Porém, o fornecimento de MgO aumentou ($P < 0,05$) o pH no íleo (7,49 vs 7,85) e nas fezes (6,54 vs 7,18). O aumento do pH fecal através da suplementação de MgO é algo bastante comum na literatura (ERDMAN *et al.*, 1980; ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982; THOMAS *et al.*, 1984), sendo que a resposta parece ser dose dependente (SCHAEFER *et al.*, 1982; TEH; HEMKEN; HARMON, 1985). A suplementação de novilhas com MgO nas doses de 0, 50 e 100 g/d aumentou ($P < 0,01$) o pH fecal de maneira diretamente proporcional a dose, entretanto, a consistência fecal se comportou de maneira inversamente proporcional (SCHAEFER *et al.*, 1982). MgO parece diminuir o teor de MS do conteúdo fecal (ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982). O aumento do pH fecal através da adição de MgO parece não ocorrer por uma redução do amido fecal (ERDMAN *et al.*, 1980; TEH; HEMKEN; HARMON, 1985; THOMAS *et al.*, 1984), mas sim, por uma maior neutralização das fezes. Fornecimento de MgO parece aumentar o teor de magnésio nas fezes (0,34 vs 1,64% da MS, $P < 0,01$) (THOMAS *et al.*, 1984).

Embora os dados na literatura sejam consistentes para o efeito da adição de MgO sobre o aumento do pH fecal, a adição de BicNa parece não afetar essa variável (ERDMAN *et al.*, 1980; ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982; ESCOBOSA *et al.*, 1984; KILMER; MULLER; WANGSNESS, 1980; NEIDERFER *et al.*, 2020; RUSSELL; YOUNG; JORGENSEN, 1980; THOMAS *et al.*, 1984). Apesar de incomum, o fornecimento de 2% da MS de BicNa aumentou o pH fecal (5,97 vs 6,54, $P < 0,01$) em comparação com animais controle (HAALAND; TYRRELL, 1982).

Destarte, o efeito da suplementação de agentes neutralizantes sobre a integridade do trato gastrointestinal, através de mecanismos relacionados ao aumento de pH precisam ser melhor avaliados na literatura. Uma vez que, baixo pH pode afetar a permeabilidade da mucosa do rúmen e cólon (ASCHENBACH *et al.*, 2019; EMMANUEL *et al.*, 2007) e levar a aumentos as concentrações de LPS e proteínas de fase aguda no sangue (KHAFIPOUR; KRAUSE; PLAIZIER, 2009).

2.7 Absorção e metabolismo dos íons magnésio e sódio

Entender os mecanismos absorptivos e o metabolismo de Na e Mg se faz necessário para uma melhor compreensão de como a suplementação de BicNa e de MgO podem alterar diversas variáveis respostas. Entre elas, as relacionadas aos parâmetros sanguíneos, concentração de íons no sangue e equilíbrio ácido básico. Após atingirem a corrente sanguínea, esses íons têm diversas funções metabólicas nas quais serão discutidas detalhadamente nas seções desse capítulo.

2.7.1 Magnésio

O magnésio é um cátion, em sua maioria intracelular, é um importante cofator enzimático, vital para a maioria das rotas metabólicas, indispensável para a condução nervosa, função muscular e formação mineral dos ossos (NRC, 2001). Em bezerros o magnésio é absorvido principalmente através do intestino delgado (NRC, 2001), entretanto, o lugar de absorção muda com a idade. Em ruminantes adultos, a maioria da absorção de Mg^{2+} parece ocorrer através do rúmen e retículo (TOMAS; POTTER, 1976), mas, pode ocorrer através do intestino grosso, podendo ser utilizado para o tratamento de hipomagnesemia aguda (MEYER; BUSSE, 1975). Uma importante característica para que o magnésio seja absorvido é que ele precisa estar na sua forma ionizada (Mg^{2+}). A proporção do magnésio na sua forma iônica parece ser de 34 a 77 % de todo magnésio (DALLEY *et al.*, 1997; GRACE; CAPLE; CARE, 1988) e é dependente de vários fatores (DALLEY *et al.*, 1997; JOHNSON; HELLIWELL; JONES, 1988; XIN; TUCKER; HEMKEN, 1989). A absorção desse mineral parece ocorrer de três maneiras: 1) Transporte paracelular. 2) Transporte transcelular dependente de diferença potencial e sensível ao potássio. 3) Transporte transcelular independente de diferença potencial e não sensível ao potássio (GOFF, 2018).

O transporte paracelular de Mg^{2+} através da parede ruminal parece ser incomum com as dietas tipicamente utilizadas, níveis moderados de magnésio. Entretanto, no intestino delgado existe uma significativa secreção de magnésio para o lúmen intestinal através da via paracelular, fato que está ligado a secreção de Cl^- pelas células da cripta no intestino (LEONHARD-MAREK; MARTENS, 1996). O fato de ocorrer uma secreção líquida de magnésio no intestino delgado, deveria ser levado em consideração quanto a avaliação da biodisponibilidade de produtos à base de magnésio. Talvez, a avaliação da absorção aparente no compartimento ruminal seja de mais valia do que a avaliação da absorção quando se leva em consideração todo trato gastrointestinal.

O transporte transcelular de magnésio através do epitélio ruminal e reticular é o de maior importância. Nesse tipo de transporte, a primeira barreira que os íons de magnésio encontram é a membrana apical das células da camada granulosa. A concentração de magnésio total dentro dessas células pode variar de 5 a 20 mM, desses, apenas uma pequena parte está na forma de magnésio livre 0,7 mM, variando de 0,4 a 1,0 mM (GOFF, 2018). No microambiente ruminal, próximo as células da granulosa, as concentrações de Mg^{2+} parecem variar de 2 a 6 mM, quando dietas com típicas concentrações de magnésio são fornecidas (JOHNSON; AUBREY-JONES, 1989; SCHWEIGEL; MARTENS, 2000). Menores valores de pH são observados no

microambiente próximo a superfície absorptiva, sendo cerca de 0,3 a 0,7 unidades inferior que o pH observado em outras partes do rúmen. Esse fenômeno ocorre devido ao contratransporte de íons sódio e hidrogênio na membrana apical das células da granulosa levando uma maior proporção magnésio na sua forma iônica (Mg^{2+}) (DALLEY *et al.*, 1997). Dessa forma, temos que as concentrações de Mg^{2+} são maiores na membrana apical do que no interior dessas células, que junto ao fato de que quando observamos a diferença de potencial na membrana apical temos que o meio intracelular é mais negativo que o microambiente em contato com a membrana apical (LEONHARD-MAREK; MARTENS, 1996). Esses dois fatores, concentração de Mg^{2+} e diferença de potencial, são forças que fazem com que haja a entrada de íons magnésio para o interior da célula.

O transporte transcelular, conforme comentado anteriormente, pode ocorrer através de mecanismos dependentes ou não da diferença de potencial entre a membrana apical das células da granulosa. Com relação ao mecanismo dependente de potencial, parecem existir canais do tipo receptores de potencial transitório (TRP) específicos para íons divalentes na membrana apical das células da granulosa (MARTENS *et al.*, 2018). Através desses canais, íons Mg^{2+} podem adentrar no citosol dessas células, mesmo quando em baixas concentrações no rúmen. Aumento na expressão de canais TRP ocorre em dietas de baixo magnésio (SCHWEIGEL; VOIGT; MOHR, 2009). Entretanto, quando altas concentrações de íons potássio estão presentes no ambiente ruminal, ocorre a difusão desse íon para o interior das células da granulosa, diminuindo a diferença de potencial na membrana apical (MARTENS *et al.*, 2018). Dessa forma, o gradiente elétrico responsável por arrastar o magnésio para o interior da célula é reduzido, e é por esse motivo que essa forma de transporte transcelular também é chamado de sensível ao potássio (GOFF, 2018). O segundo mecanismo de transporte transcelular independe da diferença de potencial existente na membrana apical para a interiorização de magnésio e ocorre através do cotransporte com íons Cl^- . Esse mecanismo de transporte envolve dois íons Mg^{2+} e dois íons Cl^- e é eficiente apenas quando há altas concentrações ruminiais de Mg^{2+} no fluido ruminal (GOFF, 2018). Concentrações de íons potássio não afetam a eficiência de absorção dessa forma de transporte, por isso é também chamado de não sensível ao potássio (MARTENS; SCHWEIGEL, 2000).

Independente da forma que o magnésio atravessa a membrana apical das células da granulosa, ocorre a sua difusão através das junções do tipo gap, atingindo assim as células do estrato espinhoso e basal (GOFF, 2018). Na membrana basolateral das células do estrato basal do rúmen existem mecanismos de contratransporte para que ocorra a passagem de íons Mg^{2+}

para o sangue. Os íons Na^+ , presentes em grande quantidade no espaço intersticial são lançados para dentro e íons Mg^{2+} lançados para fora das células do estrato basal, dessa forma, permitindo que íons magnésio atinjam o compartimento sanguíneo (SCHWEIGEL *et al.*, 2006). A grande concentração de íons sódio no espaço intersticial é mantida pela presença da enzima Na^+/K^+ ATPase presente na membrana basolateral das células do estrato basal.

Após exposto os diferentes mecanismos pelos quais íons Mg^{2+} podem ser absorvidos é preciso compreender os inúmeros fatores que afetam a solubilidade, absorção e biodisponibilidade de magnésio. Entre eles podemos destacar os níveis dietéticos de potássio, sódio, e cálcio, uso ou não de monensina, nível de amônia e presença de ácidos graxos no rúmen, tamanho de partícula da fonte de magnésio, pH ruminal e até mesmo fatores genéticos do animal.

Baixas concentrações de magnésio no fluído ruminal podem ser observadas quando se fornece dietas contendo baixos teores de magnésio, ou quando os animais estão sendo alimentados com pastagens adubadas com altos teores de potássio (MAYLAND, 1988). Alta concentração de potássio na dieta pode reduzir a absorção de magnésio (NEWTON *et al.*, 1972). Por outro lado, quando sódio está em baixa concentração no fluído ruminal, a sua adição pode beneficiar a absorção de magnésio. Falta de sódio induz a secreção de aldosterona, reduzindo a quantidade de sódio na saliva e aumentando a concentração de potássio (MARTENS *et al.*, 1987). Alta concentração de potássio, por sua vez, pode reduzir a absorção de magnésio. Dietas contendo altas concentrações de cálcio e consequentemente altas concentrações ruminais desse íon podem aumentar a competição dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} pelos canais de íons divalentes presentes na membrana apical das células da granulosa (KRONQVIST *et al.*, 2011; LEONHARD-MAREK *et al.*, 2005). Monensina pode aumentar a absorção de Mg^{2+} (GREENE; SCHELLING; BYERS, 1986), esse efeito parece ser devido a uma redução nas concentrações ruminais de K^+ . O efeito negativo do potássio sobre a absorção de magnésio parece estar relacionado com a despolarização da membrana apical das células epiteliais (MARTENS *et al.*, 2018). Dietas com teores mais elevados de potássio e nitrogênio resultaram em menores eficiências de absorção de magnésio (GREENE; FONTENOT; WEBB, 1983). Elevação rápida nos níveis de amônia pode reduzir a absorção de magnésio, entretanto, parece ocorrer adaptação com o tempo (GABEL; MARTENS, 1986). Magnésio também pode se complexar com ácidos graxos, sejam eles palmítico, linoleico, linolênico e formar sais insolúveis (NRC, 2001).

Outro fator que afeta a absorção do magnésio é o tamanho de partícula do MgO (XIN; TUCKER; HEMKEN, 1989), sendo que a solubilidade e consequentemente a absorção são maiores quando se reduz o tamanho de partícula do óxido. O MgO é a fonte de magnésio inorgânico mais usada na dieta de ruminantes (GOFF, 2018). Estudos tem mostrado que o coeficiente de absorção de magnésio de fontes de óxidos de magnésio é entre 28 a 49% (MOORE; FONTENOT; TUCKER, 1971; STORRY; ROOK, 1963).

A concentração de Mg^{2+} no rúmen é extremamente dependente do pH ruminal, se comportando de uma maneira inversamente proporcional. Entre valores de pH 5 e 7, o que normalmente é observado no rúmen, uma pequena alteração no pH pode afetar de maneira significativa a concentração de Mg^{2+} (DALLEY *et al.*, 1997). Essa relação entre pH e concentração de Mg^{2+} parece explicar o fato de magnésio oriundo de concentrado ser mais disponível para absorção do que magnésio oriundo de forragem (MILLER; BRITTON; ANSARI, 1972), baixos níveis de CNF diminuir a disponibilidade de magnésio (METSON *et al.*, 1966). Fornecimento de solução de amido na forma de drench aumentar as concentrações plasmáticas (WILSON *et al.*, 1969) e a digestibilidade (GIDUCK; FONTENOT, 1987) de magnésio. A explicação da relação entre pH e Mg^{2+} ocorre segundo Martens *et al.* (2018) porque o aumento do pH causa aumento da dissociação dos prótons dos seus respectivos ânions, dessa forma, ocorre um aumento de ânions ligantes no material ingerido, facilitando a ligação do Mg^{2+} .

O transporte de magnésio pelo rúmen parece ser influenciado pela raça do animal (LEONHARD-MAREK; MAREK; MARTENS, 1998). Dessa forma, efeitos genéticos parecem estar envolvidos na diferença de capacidade de transporte de magnésio, o que pode contribuir para a herdabilidade da característica concentração de magnésio no plasma (TSIAMADIS *et al.*, 2016).

Em um animal adulto, apenas cerca de 0,2% do magnésio está no sangue, outros 1,0% nos fluídos extracelulares, 28,8% dentro das células e 70,0% nos ossos (MARTENS *et al.*, 2018). As concentrações de magnésio no plasma normalmente variam de 0,75 a 1 mmol/L, ou 1,8 a 2,4 mg/dL (MAYLAND, 1988). Embora a maioria do magnésio estando nos ossos, eles não são uma fonte significativa desse mineral (HOULLIER, 2014). O que regula o metabolismo ósseo são os níveis sanguíneos de cálcio e não o status de magnésio. A relação entre cálcio e magnésio nos ossos é cerca de 42:1. Logo, uma mobilização óssea para fornecimento de magnésio resultaria em problemas no metabolismo de cálcio (FONTENOT *et al.*, 1989). Dessa forma, o magnésio oriundo da dieta é de extrema importância para a

manutenção dos níveis séricos. De acordo com Martens *et al.* (2018), o fato de os animais não terem um sistema integrado e regulado para controlar os níveis de magnésio, como se tem para o cálcio, parece ser uma evidência que o déficit de magnésio não foi um problema durante o processo de evolução.

Do magnésio presente no sangue cerca de 60 a 80% do parece ser filtrado pelo rim e fazer parte do ultrafiltrado. No túbulo proximal, cerca de 20 a 30% do magnésio é reabsorvido. A reabsorção nessa porção do néfron parece ser um processo passivo e não regulado. A maior parte da reabsorção ocorre na porção ascendente da alça de Henle, correspondendo a cerca de 60 a 70% do magnésio reabsorvido (MARTENS *et al.*, 2018). Cerca de 5 a 10% ocorre no túbulo contorcido distal. A excreção renal de Mg^{2+} parece ser dependente da sua concentração plasmática. Maior concentração plasmática, maior a excreção urinária de magnésio, justamente pelo fato de os rins serem os locais de maior regulação dos níveis plasmáticos de magnésio. Concentrações plasmáticas em vacas de leite menores que 0,8 mmol/L é considerado um risco para hipomagnesemia. De acordo com Goff (1988), concentração sanguínea de magnésio parece dar uma boa ideia da adequação dos níveis de magnésio vindos da dieta e sua absorção.

2.7.2 Sódio

O sódio é o cátion predominante do sangue e fluídos extracelulares, de extrema importância no processo de absorção de açúcares, aminoácidos e água. No processo de evolução dos bovinos, o sódio aparentemente era um mineral pouco presente nas dietas. Uma evidência para isso é que esses animais evoluíram um processo absorptivo bastante efetivo que ocorre ao longo de quase todo trato gastrointestinal, destacando o rúmen, intestino delgado e intestino grosso. Praticamente 100% do sódio dietético é absorvido, uma possível explicação se deve ao fato de que em solução quase a totalidade do sódio esteja em seu estado ionizado (Na^+) (GOFF, 2018). Outro ponto importante com relação a absorção de sódio é que um processo intimamente ligado a absorção de cloro, uma maneira encontrada pelo organismo para a manutenção da eletroneutralidade dos fluídos corporais. De acordo com Goff (2018), o processo de absorção do sódio pode acontecer de duas maneiras. 1) transporte paracelular, através das “*tight junctions*”. 2) transporte transcelular.

O transporte passivo paracelular dificilmente ocorre em condições de baixas concentrações de sódio na dieta. Ao contrário, normalmente ocorre em condições nas quais há altas concentrações de sódio na dieta e conseqüentemente no lúmen do trato digestivo (GOFF, 2018). Essa dependência de altas concentrações dietéticas de sódio para que o transporte passivo paracelular ocorra se deve ao fato de que no espaço intersticial, logo abaixo das “*tight*

junctions”, altas concentrações de Na^+ são encontradas, o que é causado, entre alguns motivos, pelo transporte transcelular de sódio. A alta concentração de sódio presente no espaço intersticial além criar um gradiente químico que dificulte a difusão de sódio, cria um gradiente elétrico, que dificulta ainda mais que ocorra a passagem de sódio de maneira paracelular.

Conforme já discutido, o transporte transcelular é responsável por quase a totalidade do sódio absorvido. Existem diferentes maneiras, nas quais trataremos adiante, pelas quais o sódio atravessa a membrana apical das células. Entrando, todas ocorrem a favor de um gradiente químico e elétrico. Após atingir o citosol, os íons sódio, através da difusão vão em direção a membrana basolateral, local por onde os íons de sódio são bombeados para o espaço intersticial, contra seu gradiente elétrico e de concentração, através da enzima $3\text{Na}^+/\text{2K}^+$ ATPase (bomba de sódio e potássio) (GURNEY *et al.*, 2017).

Dentre os diferentes tipos de transportes de sódio que ocorrem através da membrana apical das células em contato com o lúmen do trato gastrointestinal temos 1) Contratransporte de Na^+/H^+ . 2) Simporte de $\text{Na}^+/\text{Hexoses}$ e $\text{Na}^+/\text{aminoácidos}$. 3) Canais epiteliais de Na^+ . 4) Cotransporte de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Esses diferentes mecanismos absorptivos podem estar em porções específicas do trato gastrointestinal ou em sua totalidade.

O contratransporte Na^+/H^+ parece ocorrer em todo o trato gastrointestinal (GOFF, 2018). Nesse tipo de transporte, um íon Na^+ presente no lúmen do trato gastrointestinal adentra a célula, através da membrana apical a favor do seu gradiente, favorecendo a saída, em direção ao lúmen, de um íon H^+ (MARTENS; GABEL, 1988). Ou seja, há a acidificação no lúmen do trato gastrointestinal. Cerca de metade do sódio oriundo da dieta e saliva já parece ser absorvido nos pré-estômagos (DOBSON, 1959). No rúmen, retículo e omaso, os íons de sódio absorvidos através do contratransporte com íons H^+ , processo que ocorre nas células do estrato granuloso, se difundem através de junções do tipo gap, que conectam as células do estrato granuloso com as células do estrato espinhoso e basal. Ao atingirem o extrato basal, as células ali presentes, com alta atividade metabólica por terem grandes quantidades de mitocôndrias, são capazes transportar o sódio para o espaço intersticial através da enzima $3\text{Na}^+/\text{2K}^+$ ATPase (GRAHAM; SIMMONS, 2005; MARTENS; GABEL; STROZYK, 1991). A acidificação do microambiente próximo a membrana apical das células da granulosa através desse tipo de transporte, pode auxiliar na absorção de ácidos graxos de cadeia curta, uma vez que mais desses ácidos estarão na sua forma não dissociada, ou seja, eletricamente neutros, facilitando a sua difusão pelas células da parede dos pré-estômagos (ASCHENBACH *et al.*, 2011).

O simporte de Na^+ /Hexose e Na^+ /aminoácido acontece na membrana apical dos enterócitos, tanto no duodeno como no jejuno (WRIGHT, 1993). Íons de sódio presentes no lúmen intestinal, a favor do seu gradiente químico e elétrico são responsáveis pela difusão facilitada de aminoácidos e glicose através da membrana apical dos enterócitos.

Outro mecanismo de absorção de Na^+ é através dos canais epiteliais presentes no cólon. Eles permitem que a absorção de sódio, a favor do seu gradiente elétrico e químico, ocorra mesmo em baixas concentrações de sódio luminal. Esses canais sofrem regulação hormonal da aldosterona, secretada em situações de baixa pressão sanguínea, fazendo com que haja aumento da síntese das proteínas constituintes desses canais de sódio no cólon. O aumento desses canais pode aumentar ainda mais a absorção de sódio nessa porção do trato gastrointestinal (KUNZELMANN; MALL, 2002).

O mecanismo de cotransporte de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ parece estar presente em todas as porções do trato gastrointestinal, sendo mais relevante no íleo e cólon. É um processo eletroneutro pois a entrada de íons Na^+ através da membrana apical está relacionado a entrada de íons HCO_3^- (GLEESON, 1992; SANDLE, 1988).

De acordo com a literatura revisada, e diferente do que acontece para o magnésio, parecem não existir fatores evidentes que interfiram na absorção das fontes de sódio. De acordo com Goff (2018), fontes de Na^+ apresentam quase 100% na eficiência de absorção, provavelmente pelo sódio estar quase em sua totalidade, quando em solução, na sua forma ionizada.

2.8 Parâmetros sanguíneos e balanço ácido básico

Os trabalhos na literatura são consistentes com relação ao efeito da suplementação de MgO sobre o aumento da concentração sérica de magnésio (ERDMAN *et al.*, 1980; ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982; TEH; HEMKEN; HARMON, 1985; THOMAS *et al.*, 1984). Entretanto, existem relatos de que esse parâmetro não foi alterado (ARAMBEL *et al.*, 1988). Resposta na concentração de magnésio no sangue pode ser considerada uma medida da solubilidade e da efetividade do produto MgO testado. Uma maneira prática que pode ser utilizada para mensurar a disponibilidade do MgO foi proposta por Goff (2014). De acordo com o autor se o produto a base de MgO for de boa qualidade ele deve resultar em um pH maior que oito após a realização da metodologia proposta. O processo de calcinação é uma importante etapa da produção de MgO (BACH *et al.*, 2018), o superaquecimento do material, carbonato de magnésio, pode reduzir a reatividade e a disponibilidade do magnésio (GOFF, 2014). O processo de moagem e o tamanho de partícula resultante também podem afetar a resposta

animal (XIN; TUCKER; HEMKEN, 1989). Em um animal adulto, apenas cerca de 0,2% do magnésio está no sangue, outros 1,0% nos fluídos extracelulares, 28,8% dentro das células e 70,0% nos ossos (MARTENS *et al.*, 2018). As concentrações de magnésio no plasma normalmente variam de 0,75 a 1 mmol/L, ou 1,8 a 2,4 mg/dL (MAYLAND, 1988). Embora a maioria do magnésio estando nos ossos, eles não são uma fonte significativa desse mineral (HOULLIER, 2014). Dessa forma, o magnésio oriundo da dieta é de extrema importância para a manutenção dos níveis séricos.

Ao contrário do que acontece com o magnésio, a suplementação de BicNa, parece não afetar de maneira significativa os níveis séricos de sódio (ARAMBEL *et al.*, 1988; BERNARD *et al.*, 2014; EMERY; BROWN; THOMAS, 1964; ERDMAN *et al.*, 1980; ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982; ESCOBOSA *et al.*, 1984; KILMER; MULLER; SNYDER, 1981; THOMAS *et al.*, 1984). Hu e Murphy (2004) mostraram em sua meta-análise que as concentrações de sódio na dieta não afetaram as concentrações de sódio no sangue, sendo que os valores reportados por esses autores variaram de 123,75 a 161,50 mEq/L, com uma média de 140,75 mEq/L. Entretanto, há trabalhos na literatura que reportaram aumento nas concentrações séricas de sódio com a suplementação de BicNa (STAPLES *et al.*, 1988; TEH; HEMKEN; HARMON, 1985). O aumento na excreção urinária de sódio é uma explicação ao fato de que normalmente não se tem aumento de sódio sérico com o fornecimento de BicNa ou aumento nas concentrações de sódio na dieta (HU; MURPHY, 2004; KILMER; MULLER; SNYDER, 1981; PÉREZ-RUCHEL; REPETTO; CAJARVILLE, 2014; THOMAS *et al.*, 1984). De fato, existem preocupações relacionadas ao fornecimento de BicNa e a maior excreção de sódio (BERG *et al.*, 2010). De acordo com esses autores altos níveis de sódio podem afetar a água para consumo humano, animal e para irrigação. Além do mais, alta concentração de sódio pode contribuir para a degradação do solo, reduzindo a produção de biomassa (MENGEL; KIRKBY, 2001).

Goff (2018) em sua revisão sobre minerais avaliou importantes conceitos quando se tratando de equilíbrio ácido básico de uma solução. De acordo com esse autor, a visão tradicional que se tem sobre a fisiologia do equilíbrio ácido básico é que um ácido é uma substância capaz de doar um próton (H^+) e uma base é uma substância que é capaz de aceitar um próton. De acordo com essa visão tradicional, muitas explicações podem ser dadas através da equação de Henderson-Hasselbalch. Um ácido em seu estado não dissociado pode ser representado por HA, nesse caso, é considerado um ácido porque pode doar um próton. O quanto desse ácido será dissociado pode ser definido pela constante de dissociação do ácido

(pK_a), algo intrínseco da substância, e do pH do meio. Quando em seu estado dissociado o ácido pode ser descrito como $H^+ + A^-$, sendo que o ânion resultante do ácido agora pode ser considerado uma base, uma vez que pode receber um próton. Ainda de acordo com o autor, as mudanças de pH em soluções biológicas podem ser facilmente previstas de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch. Por exemplo, no sangue aonde o principal sistema tampão é o de íons bicarbonato temos que o pH pode ser definido como $pH = 6,1 + \log_{10}(HCO_3^- / H_2CO_3)$. De acordo com Goff (2018), um dos problemas da forma tradicional em lidar com equilíbrio ácido básico é que ela não é capaz de explicar o efeito da suplementação de sais aniônicos sobre o pH sanguíneo. Uma visão alternativa proposta para explicar esse efeito sobre o pH é a teoria que leva em consideração o efeito de íons e ácidos fracos sobre o pH de determinada solução. De acordo com essa teoria pode-se definir um ácido como uma substância que quando em água é capaz de gerar um aumento de íons H^+ e base, uma substância capaz de gerar redução na concentração de íons H^+ (CONSTABLE, 2014; TREFZ; CONSTABLE; LORENZ, 2015). De acordo com essa teoria, qualquer solução deve ser mantida em eletroneutralidade, ou seja, a quantidade de cargas positivas e negativas de uma solução devem permanecer iguais. Um exemplo dado pelo o autor é quando temos água pura, teremos uma concentração tanto de H^+ como de OH^- de 1×10^{-7} . Logo, o pH da água será de 7 uma vez que pH é dado por $pH = \text{Log } 1/[H^+]$. Se a essa solução de água for adicionado Na^+ , para manter o equilíbrio de cargas, a concentração de H^+ será reduzida, de tal maneira que $[H^+] + [Na^+] = [OH^-]$ seja atingido, nesse caso a adição de íons de sódio resultarão em um aumento do pH. As concentrações de H^+ e OH^- são manipuladas em resposta a adição de cargas através da dissociação da água ($H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$).

No sangue, em condições normais, a quantidade de cátions excede, levemente, a concentração de ânions, fazendo com que o pH seja levemente básico (GOFF, 2018). A concentração de íons H^+ deve ser minuciosamente controlada e mantida em limites bastante restritos para que os processos biológicos ocorram normalmente. O pH sanguíneo é dependente de basicamente três fatores: 1) Respiração, na qual remove do sangue íons bicarbonato na forma de CO_2 . 2) Concentração de proteínas, que em sua grande maioria são produzidas pelo fígado e apresentam geralmente carga negativa. 3) Diferença entre cátions e ânions presentes no sangue, que em grande parte vêm da dieta. A eficiência de absorção de sódio parece ser praticamente 100%. O magnésio, apesar de não ser absorvido com tanta eficiência como o sódio, também pode exercer seu efeito sobre os parâmetros ácido básico do sangue uma vez que for absorvido e atingir o sangue (GOFF, 2018). De acordo com esse mesmo autor, mesmo os microminerais

têm essa capacidade de influenciar o equilíbrio ácido básico do sangue. Entretanto, por estarem presentes em quantidades tão pequenas, normalmente, não consideramos os seus efeitos. Por exemplo, quando o BicNa é suplementado, cerca de 100% dos íons sódio são absorvidos e entram no sangue, entretanto, os íons bicarbonato gerados formarão em sua grande maioria CO_2 e H_2O , não chegando ao sangue. Logo, para cada mol de NaHCO_3 suplementado levará a um mol extra de íons Na^+ e mínimas quantidades de cargas negativas chegando ao sangue (GOFF, 2018). Essa quantidade extra de cargas positivas que chegam ao sangue leva a uma necessidade de redução da concentração de íons H^+ para manter a eletroneutralidade, ocasionando um possível aumento do pH sanguíneo. A adição de cátions na dieta, têm em um primeiro momento uma ação de tamponamento ou neutralização do rúmen, depois, quando absorvidos podem agir através da alcalinização do sangue.

Com relação aos parâmetros ácido básico do sangue, Hu e Murphy (2004) mostraram em sua meta-análise, com vacas leiteiras, um aumento linear para pressão parcial de CO_2 (pCO_2) e aumento quadrático para os íons bicarbonato no sangue com o aumento do DCAD da dieta ($\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^-$). Kellaway *et al.* (1977) forneceram para bezerros doses crescentes de BicNa no concentrado (0, 3, 6 e 9%) e observaram aumento ($P < 0,01$) linear da concentração de íons bicarbonato no sangue (26,7, 28,2, 33,7, 37,4 mEq/L), excesso de bases (0,75, 1,78, 7,67, 11,17 mEq/L) e pCO_2 (46,3, 47,7, 51,0, 54,5 mmHg). Todos os fluidos corporais devem ser mantidos em eletroneutralidade, portanto, quanto maior o DCAD, teoricamente mais cargas positivas serão absorvidas e mais íons bicarbonato terão que ser gerados para manter o balanço de cargas (HU; MURPHY, 2004). O aumento dos íons bicarbonato leva, por sua vez, a um aumento do CO_2 , uma vez que a relação entre os dois deve ser mantida praticamente constante no sangue (JONES, 2010). Apesar do DCAD ter seu efeito sobre os parâmetros ácido básicos do sangue, outros fatores parecem interferir na resposta. Xin, Tucker e Hemken (1989) suplementaram três tipos de MgO com diferentes reatividades. Os autores observaram que a pCO_2 aumentou comparativamente ao controle apenas para um tipo de MgO , o de maior solubilidade. Diferentes solubilidades e conseqüentemente diferentes absorções de magnésio influenciam a quantidade de íons que chegam no sangue e conseqüentemente, a quantidade de íons bicarbonatos gerados para manter a eletroneutralidade. Dessa forma, o simples cálculo do DCAD de uma dieta, não levando em consideração a fonte, e por sua vez a solubilidade e disponibilidade de determinado mineral parece não ser correto. Outro ponto importante que deve ser levado em consideração é que as fórmulas utilizadas para o cálculo do DCAD normalmente utilizam apenas os íons sódio, potássio e cloro (HU; MURPHY, 2004) ou sódio, potássio, cloro e enxofre (BLOCK, 1984),

não levando em consideração os efeitos que outros íons, quando absorvidos e atingem o sangue, podem exercer.

Apesar do discorrido, existem trabalhos na literatura em que o fornecimento de agentes neutralizantes não alterou o balanço ácido básico do sangue. A suplementação de 0,4% de MgO e 0,8% de BicNa não afetaram o balanço ácido básico do sangue de vacas em começo de lactação (ARAMBEL *et al.*, 1988). O fornecimento de 0,85% de BicNa não afetou as concentrações de íons bicarbonato no sangue (BERNARD *et al.*, 2014). A adição de 1% de BicNa e 0,8% de MgO não afetaram as concentrações de íons bicarbonato e pCO₂ no sangue (ERDMAN; HEMKEN; BULL, 1982). Além do mais, existem trabalhos em que a resposta foi até mesmo diferente do esperado. Escobosa *et al.* (1984) observaram que a suplementação de BicNa não alterou a pO₂, reduziu ($P < 0,05$) a pCO₂, concentração de CO₂ total, íons bicarbonato e o excesso de bases. Entretanto, nesse trabalho amostras de sangue foram coletadas, de acordo com os autores, na artéria coccígea, o que pode ser duvidoso, uma vez que artéria e veia coccígea estão intimamente relacionadas. Como já discutido anteriormente, uma explicação para a diferença de resultados, pelo menos quando se trata da suplementação de MgO, é a solubilidade e qualidade do material utilizado. Entretanto, a hora de coleta do sangue e a temperatura/índice de temperatura e umidade (ITU) do ambiente parecem afetar a resposta dos agentes neutralizantes sobre o balanço ácido-básico do sangue (KHELIL-ARFA; FAVERDIN; BOUDON, 2014).

Khelil-Arfa, Faverdin e Boudon (2014) avaliaram o efeito da temperatura ambiente (15 vs. 28°C, ITU de 66,0 e 78,7, respectivamente) e do nível de sódio na dieta (0,21 vs. 0,49 % da MS) sobre o balanço ácido básico de vacas em lactação e vacas secas. O aumento de sódio na dieta foi feito através de uma inclusão extra de BicNa na dieta (0,5 vs. 1,9% da MS). Maior inclusão de BicNa tendeu aumentar ($P \leq 0,10$) o pH sanguíneo apenas das vacas secas durante a mensuração na parte da manhã (7,396 vs. 7,420), entretanto não houve diferença na parte da tarde, tanto para vacas secas como em lactação. Pressão parcial de CO₂ não foi afetada pela maior inclusão de BicNa, independente do tempo de coleta ou do estágio fisiológico dos animais. Durante o período da manhã, as vacas secas, e durante o período da tarde, as vacas em lactação, recebendo maior inclusão de BicNa tiveram aumento ($P \leq 0,05$) das concentrações de íons bicarbonato (23,9 vs. 28,0 mmol/L; 30,6 vs. 34,3 mmol/L; vacas secas e lactação, respectivamente) e excesso de base no sangue (-0,6 vs. 3,7 mmol/L; 6,4 vs. 10,0 mmol/L; vacas secas e lactação, respectivamente), entretanto, essa diferença foi observada apenas para as vacas na temperatura ambiente mais baixa. Temperatura mais elevada aumentou ($P \leq 0,01$) a

frequência respiratória tanto em vacas secas (23,1 vs. 40,3 respirações/min) como em lactação (22,7 vs. 49,3 respirações/min), o que levou a uma redução da $p\text{CO}_2$ ($P \leq 0,05$) tanto em vacas secas (43,4 vs. 39,9 mm de Hg) como em vacas em lactação (47,0 vs. 41,6 mm de Hg). A partir desse dado podemos compreender que o efeito dos agentes neutralizantes, nesse caso o BicNa, pode ou não influenciar o balanço ácido básico do sangue dependendo da temperatura ambiente. Animais quando em temperaturas mais elevadas, tendem a aumentar a frequência respiratória na tentativa de controlar a temperatura corporal. Essa resposta homeorrética do animal leva a uma diminuição das concentrações de CO_2 , íons bicarbonato e aumento na concentração de O_2 no sangue, podendo causar anulação dos efeitos da suplementação de BicNa sobre esses parâmetros. Em resumo, agentes neutralizantes parecem ser mais efetivos em causar alterações dos parâmetros ácido básicos do sangue sobre condições de termo neutralidade do que em condições de estresse térmico.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1598-1624, 2000.
- ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1447-1462, 1997.
- ALVES, S. P.; BESSA, R. J. B. The trans-10, cis-15 18:2: a missing intermediate of trans-10 shifted rumen biohydrogenation pathway? **Lipids**, v. 49, n. 6, p. 527-541, 2014.
- APAJALAHTI, J.; VIENOLA, K.; RAATIKAINEN, K.; HOLDER, V.; MORAN, C. A. Conversion of branched-chain amino acids to corresponding isoacids- an in vitro tool for estimating ruminal protein degradability. **Frontiers in Veterinary Science**, 2019.
- ARAMBEL, M. J.; WIEDMEIER, R. D.; CLARK, D. H.; LAMB, R. C.; BOMAN, R. L.; WALTERS, J. L. Effect of sodium bicarbonate and magnesium oxide in an alfalfa-based total mixed ration fed to early lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 1, p. 159-163, 1988.
- ASCHENBACH, J. R.; BILK, S.; TADESSE, G.; STUMPF, F.; GABEL, G. Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, 296, n. 5, p. G1098-G1107, 2009.
- ASCHENBACH, J. R.; PENNER, G. B.; STUMPF, F.; GABEL, G. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of Animal Science**, 89, n. 4, p. 1092-1107, Apr 2011.
- ASCHENBACH, J. R.; ZEBELI Q.; PATRA, A. K.; GRECO G.; AMASHEH, S.; PENNER, G. B. Symposium review: the importance of the ruminal epithelial barrier for a healthy and productive cow. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 1866-1882, 2019.
- BACH, A.; GUASCH, I.; ELCOSO, G.; DUCLOS, J.; KHELIL-ARFA, H. Modulation of rumen pH by sodium bicarbonate and a blend of different sources of magnesium oxide in lactating dairy cows submitted to a concentrate challenge. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 11, p. 9777-9788, 2018.
- BANNINK, A.; DE VISSER, H.; KLOP, A.; DIJKSTRA, J.; FRANCE, J. Causes of inaccurate prediction of volatile fatty acids by simulation models of rumen function in lactating cows. **Journal of Theoretical Biology**, v. 189, n. 4, p. 353-366, 1997.
- BAUCHART, D. Lipid absorption and transport in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3864-3881, 1993.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v. 70, n. 1-2, p. 15-29, 2001.

BAUMAN, D. E.; HARVATINE, K. J.; LOCK, A. L. Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. **Annual review of nutrition**, v. 31, p. 299-319, 2011.

BAUMGARD, L. H.; SANGSTER, J. K.; BAUMAN, D. E. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 6, p. 1764-1769, 2001.

BERG, J.; PRICE, P.; WESTCOT, D.; MEYER, D. **The industry wide salt study for existing milk cow dairies**. Report prepared by the UC Davis Dairy Science Dept for Central Valley Regional Water Quality Control Board Order No. R5-2007-0035. Waste Discharge Requirements General Order For Existing Milk Cow Dairies. Central Valley Regional Water Quality Control Board, Sacramento, CA, USA, 2010.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological reviews**, v. 70, n. 2, p. 567-590, 1990.

BERNARD, J. K.; WEST, J. W.; MULLIS, N.; WU, Z.; TAYLOR, S. J. Evaluation of calcareous marine algae supplements on production and metabolic parameters of early lactation dairy cows. **The Professional Animal Scientist**, v. 30, n. 6, p. 649-656, 2014.

BLOCK, E. Manipulating dietary anions and cations for parturient dairy cows to reduce incidence of milk fever. **Journal of dairy science**, v. 67, n. 12, p. 2939-2948, 1984.

BOERMAN, J. P.; FIRKINS, J. L.; ST-PIERRE, N. R.; LOCK, A. L. Intestinal digestibility of long-chain fatty acids in lactating dairy cows: A meta-analysis and meta-regression. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8889-8903, 2015.

BOERNER, B. J.; BYERS, F. M.; SCHELLING, G. T.; COPOOCK, C. E.; GREENE, L. W. Trona and sodium bicarbonate in beef cattle diets: Effects on site and extent of digestion. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 1, p. 303-308, 1987.

CABRITA, A. R. J.; VALE, J. M. P.; BESSA, R. J. B.; DEWHURST, R. J.; FONSECA, A. J. M. Effects of dietary starch source and buffers on milk responses and rumen fatty acid biohydrogenation in dairy cows fed maize silage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 152, n. 3-4, p. 267-277, 2009.

CASSIDA, K. A.; MULLER, L. D.; SWEENEY, T. F. Sodium sesquicarbonate for early lactation dairy cows fed corn silage-based diets. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 2, p. 381-387, 1988.

CASTRO, L. P.; Pereira, M. N.; DIAS, J. D. L.; LAGE, D. V. D.; BARBOSA, E. F.; MELO, R. P.; FERREIRA, K.; CARVALHO, J. T. R.; CARDOSO, F. F.; PEREIRA, R. A. P. Lactation performance of dairy cows fed rehydrated and ensiled corn grain differing in particle size and proportion in the diet. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 11, p. 9857-9869, 2019.

CHRISTIANSEN, M. L.; WEBB JR, K. E. Intestinal acid flow, dry matter, starch and protein digestibility and amino acid absorption in beef cattle fed a high-concentrate diet

with defluorinated rock phosphate, limestone or magnesium oxide. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 7, p. 2105-2118, 1990.

CHRISTIE, W. W. Lipid Metabolism in Ruminant Animals. Department of Biochemistry the Hannah Research Institute Ayr, Scotland. **Review Journal Progress in Lipid Research**, 1981.

CONSTABLE, P. D. Acid-base assessment: when and how to apply the Henderson-Hasselbalch equation and strong ion difference theory. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 30, n. 2, p. 295-316, 2014.

CRICHLOW, E. C.; LEEK, B. F. Forestomach epithelial receptor activation by rumen fluids from sheep given intraruminal infusions of volatile fatty acids. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 1015-1018, 1986.

CRUYWAGEN, C. W.; TAYLOR, S.; BEYA, M. M.; CALITZ, T. The effect of buffering dairy cow diets with limestone, calcareous marine algae, or sodium bicarbonate on ruminal pH profiles, production responses, and rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 8, p. 1-9, 2015.

DANIEL, J. L. P.; RESENDE JÚNIOR, J. C. Absorption and metabolism of volatile fatty acids by rumen and omasum. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 1, p. 93-99, 2012.

DANIEL, J. L. P.; RESENDE JÚNIOR, J. C.; CRUZ, F. J. Participação do ruminoretículo e omaso na superfície absorviva total do proventrículo de bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 688-694, 2006.

DALLEY, D. E.; ISHERWOOD, P.; SYKES, A. R.; ROBSON, A. B. Effect of in vitro manipulation of pH on magnesium solubility in ruminal and caecal digesta in sheep. **Journal of Agricultural Science**, 129, p. 107-111, Aug 1997.

DAVIS, C. L.; BROWN, R. E.; BEITZ, D. C. Effect of feeding high-grain restricted-roughage rations with and without bicarbonates on the fat content of milk produced and proportions of volatile fatty acids in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 47, p. 1217-1219, 1964.

DePETERS, E. J.; FREDEEN, A. H.; BATH, D. L.; SMITH, N. E. Effect of sodium bicarbonate addition to alfalfa hay-based diets on digestibility of dietary fractions and rumen characteristics. **journal of Dairy Science**, v. 67, n. 10, p. 2344-2355, 1984.

DeVRIES, T. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; DOHME, F.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: feeding, ruminating, and lying behavior. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5067-5078, 2009.

DE SOUZA, J.; PRESEAUULT, C. L.; LOCK, A. L. Altering the ratio of dietary palmitic, stearic, and oleic acids in diets with or without whole cottonseed affects nutrient digestibility, energy partitioning, and production responses of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 172-185, 2018.

DIJKSTRA, J.; BOER, H.; VAN BRUCHEM, J.; BRUINING, M.; TAMMINGA, S. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. **British Journal of Nutrition**, v. 69, n. 2, p. 385-396, 1993.

DIJKSTRA, J.; ELLIS, J. L.; KEBREAB, E.; STRATHE, A. B.; LÓPEZ, S.; FRANCE, J.; BANNINK, A. Ruminant pH regulation and nutritional consequences of low pH. **Animal Feed Science and Technology**, v. 172, n. 1-2, p. 22-33, 2012.

DOBSON, A. Active transport through the epithelium of the reticulo-rumen sac. **The Journal of Physiology**, v. 146, n. 2, p. 235, 1959.

DOEPEL, L.; HAYIRLI, A. Exclusion of dietary sodium bicarbonate from a wheat-based diet: effects on milk production and ruminal fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 370-375, 2011.

DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, v. 78, n. 1, p. S15-S35, 1997.

EDWARDS, S. A.; POOLE, D. A. The effects of including sodium bicarbonate in the diet of dairy cows in early lactation. **Animal Production**, v. 37, n. 2, p. 183-188, 1983.

EMERY, R. S.; BROWN, L. D.; BELL, J. W. Correlation of milk fat with dietary and metabolic factors in cows fed restricted-roughage rations supplemented with magnesium oxide or sodium bicarbonate. **Journal of Dairy Science**, v. 48, n. 12, p. 1647-1651, 1965.

EMERY, R. S.; BROWN, L. D.; THOMAS, J. W. Effect of sodium and calcium carbonates on milk production and composition of milk blood and rumen contents of cows fed grain ad libitum with restricted roughage. **Journal of Dairy Science**, v. 47, n. 12, p. 1325-1329, 1964.

EMMANUEL, D. G. V.; MADSEN, K. L.; CHURCHILL, T. A.; DUNN, S. M.; AMETAJ, B. N. Acidosis and lipopolysaccharide from *Escherichia coli* B: 055 cause hyperpermeability of rumen and colon tissues. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5552-5557, 2007.

ERDMAN, R. A.; Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 12, p. 3246-3266, 1988.

ERDMAN, R. A.; BOTTS, R. L.; HEMKEN, R. W.; BULL, L. S. Effect of dietary-sodium bicarbonate and magnesium-oxide on production and physiology in early lactation. **Journal of Dairy Science**, 63, n. 6, p. 923-930, 1980.

ERDMAN, R. A.; HEMKEN, R. W.; BULL, L. S. Dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide for early postpartum lactating dairy cows: effects on production, acid-base metabolism, and digestion. **Journal of Dairy Science**, 65, n. 5, p. 712-731, 1982.

ERDMAN, R. A.; SHARMA, B. K. Effect of yeast culture and sodium bicarbonate on milk yield and composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 7, p. 1929-1932, 1989.

ESCOBOSA, A.; COPPOCK, C. E.; ROWE JR, L. D.; JENKINS, W. L.; GATES, C. E. Effects of dietary sodium bicarbonate and calcium chloride on physiological responses of lactating dairy cows in hot weather. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 3, p. 574-584, 1984.

EUBANK, W. R. Calcination studies of magnesium oxides. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 34, p. 225-229, 1951.

EWING, D. L.; JOHNSON, D. E.; RUMPLER, W. V. Corn particle passage and size reduction in the rumen of beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 5, p. 1509-1515, 1986.

FIRKINS, J. L. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. **American Institute of nutrition**, p. 1347S-1354S, 1996.

FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L. Replacement of forage or concentrate with combinations of soyhulls, sodium bicarbonate, or fat for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2752-2761, 1992.

FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L.; PALMQUIST, D. L. Replacement of corn silage with corn gluten feed and sodium bicarbonate for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1944-1952, 1991.

FONTENOT, J. P.; ALLEN, V. G.; BUNCE, G. E.; GOFF, J. P. Factors influencing magnesium absorption and metabolism in ruminants. **Journal of Animal Science**, 67, n. 12, p. 3445-3455, Dec 1989.

FREEMAN, C. P. Properties of fatty acids in dispersions of emulsified lipid and bile salt and the significance of these properties in fat absorption in the pig and the sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 23, n. 2, p. 249-263, 1969.

GABEL, G.; ASCHENBACH, J. R.; MULLER, F. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. **Animal Health Research Reviews**, 3, n. 1, p. 15-30, 2002.

GABEL, G.; MARTENS, H. The effect of ammonia on magnesium-metabolism in sheep. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 55, n. 4-5, p. 278-287, May 1986.

GAEBEL, G.; BELL, M.; MARTENS, H. The effect of low mucosal pH on sodium and chloride movement across the isolated rumen mucosa of sheep. **Journal of Experimental Physiology**, v. 74, p. 35-44, 1989.

GALIP, N. Effect of supplemental yeast culture and sodium bicarbonate on ruminal fermentation and blood variables in rams. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, n. 11-12, p. 446-452, 2006.

GIDUCK, S. A.; FONTENOT, J. P.; Utilization of magnesium and other macrominerals in sheep supplemented with different readily-fermentable carbohydrates. **Journal of Animal Science**, 65, n. 6, p. 1667-1673, Dec 1987.

GLASSER, F.; FERLAY, A.; DOREAU, M.; SCHMIDELY, P.; SAUVANT, D.; CHILLIARD, Y. Long-chain fatty acid metabolism in dairy cows: A meta-analysis of milk fatty acid yield in relation to duodenal flows and de novo synthesis. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 7, p. 2771-2785, 2008b.

GLASSER, F.; SCHMIDELY, P.; SAUVANT, D.; DOREAU, M. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. **Animal**, v. 2, n. 5, p. 691-704, 2008a.

GLEESON, D. Acid-base transport systems in gastrointestinal epithelia. **Gut**, v. 33, n. 8, p. 1134, 1992.

GOFF, J. P. Calcium and magnesium disorders. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 30, n. 2, p. 359-381, 2014.

GOFF, J. P. Invited review: mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2763-2813, 2018.

GOFF, J. P. Ruminant hypomagnesemic tetanies. In: HOWARD, J. L.; SMITH, R. A. **Current Veterinary Therapy 4: Food Animal Practice**. Philadelphia: W.B. Saunders Co, p. 215– 218, 1998.

GRACE, N. D.; CAPLE, I. W.; CARE, A. D. Studies in sheep on the absorption of magnesium from a low-molecular weight fraction of the reticulo-rumen contents. **British Journal of Nutrition**, 59, n. 1, p. 93-108, Jan 1988.

GRAHAM, C.; SIMMONS, N. L. Functional organization of the bovine rumen epithelium. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 1, p. R173-R181, 2005.

GRANT, R. J.; MERTENS, D. R. Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 10, p. 2762-2768, 1992.

GREENE, L. W.; FONTENOT, J. P.; WEBB JR, K. E. Site of magnesium and other macromineral absorption in steers fed high levels of potassium. **Journal of Animal Science**, 57, n. 2, p. 503-510, Aug 1983.

GREENE, L. W.; SCHELLING, G. T.; BYERS, F. M. Effects of dietary monensin and potassium on apparent absorption of magnesium and other macroelements in sheep. **Journal of Animal Science**, 63, n. 6, p. 1960-1967, Dec 1986.

GURNEY, M. A.; LAUBITZ, D.; GHISHAN, F. K.; KIELA, P. R. Pathophysiology of intestinal Na⁺/H⁺ exchange. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, v. 3, n. 1, p. 27-40, 2017.

HAALAND, G. L.; TYRRELL, H. F. Effects of limestone and sodium bicarbonate buffers on rumen measurements and rate of passage in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 55, n. 4, p. 935-942, 1982.

HANSEN, H. O.; KNUDSEN, J. Effect of exogenous long-chain fatty acids on lipid biosynthesis in dispersed ruminant mammary gland epithelial cells: esterification of long-chain exogenous fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 7, p. 1344-1349, 1987.

HARFOOT, C. G.; HAZLEWOOD, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. Springer, Dordrecht, p. 382-426, 1997.

HARRISON, D. G.; BEEVER, D. E.; THOMSON, D. J.; OSBOURN, D. F. Manipulation of rumen fermentation in sheep by increasing the rate of flow of water from the rumen. **The Journal of Agricultural Science**, v. 85, n.1, p. 93-101, 1975.

HARRISON, J. H.; RILEY, R. E.; LONEY, K. A. Effect of type and amount of buffer addition to grass silage-based total mixed rations on milk production and composition. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 7, p. 1824-1830, 1989.

HOOVER, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 2755-2766, 1986.

HOUILLIER, P. Mechanisms and regulation of renal magnesium transport. In: JULIUS, D. **Annual Review of Physiology**, Vol 76. Palo Alto: Annual Reviews, v. 76, p. 411-430, 2014.

HU, W.; MURPHY, M. R. Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, 87, n. 7, p. 2222-2229, Jul 2004.

HU, W.; MURPHY, M. R. Statistical evaluation of early- and mid-lactation dairy cow responses to dietary sodium bicarbonate addition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 119, n. 1-2, p. 43-54, 2005.

HUBER, J. T.; EMERY, R. S.; THOMAS, J. W.; YOUSEF, I. M. Milk fat synthesis on restricted-roughage rations containing whey, sodium bicarbonate, and magnesium oxide. **Journal of Dairy Science**, v. 52, n. 1, p. 54-59, 1969.

HUMER, E.; PETRI, R. M.; ASCHENBACH, J. R.; BRADFORD, B. J.; PENNER, G. B.; TAJAJ, M.; SUDEKUM, K. H.; ZEBELI, Q. Invited review: practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 2, p. 872-888, 2017.

JENKINS, T. C.; PALMQUIST, D. L. Effect of added fat and calcium on in vitro formation of insoluble fatty acid soaps and cell wall digestibility. **Journal of Animal Science**, v. 55, n. 4, p. 957-963, 1982.

JENKINS, T. C.; PALMQUIST, D. L. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 5, p. 978-986, 1984.

JOHNSON, C. L.; AUBREY- JONES, da. Effect of change of diet on the mineral composition of rumen fluid, on magnesium metabolism and on water balance in sheep. **British journal of nutrition**, v. 61, n. 3, p. 583-594, 1989.

JOHNSON, C. L.; HELLIWELL, S. H.; JONES, D. A. A. Magnesium-metabolism in the rumens of lactating dairy-cows fed on spring grass. **Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences**, 73, n. 1, p. 23-31, Jan 1988.

JONES, M. B. Basic Interpretation of Metabolic Acidosis. **Critical Care Nurse**, v. 30, n. 5, p. 63-69, 2010.

KALSCHUR, K. F.; TETER, B. B.; PIPEROVA, L. S.; ERDMAN, R. A. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 9, p. 2104-2114, 1997.

KAPLAN, O.; DENIZ, S.; AKIF KARSLI, M.; NURSOY, H.; AVCI, M. Effects of sodium bicarbonate, magnesium oxide and dried sugar beet pulp in diets of dairy cows on milk yield, milk composition and rumen fluid and some blood parameters. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 11, p. 1570-1574, 2010.

KELLAWAY, R. C.; BEEVER, D. E.; THOMSON, D. J.; AUSTIN, A. R.; CAMMELL, S. B.; ELDERFIELD, M. L. The effect of NaCl or NaHCO₃ on digestion in the stomach of weaned calves. **The Journal of Agricultural Science**, v. 91, n. 2, p. 497-503, 1978.

KELLAWAY, R. C.; THOMSON, D. J.; BEEVER, D. E.; OSBOURN, D. F. Effects of NaCl and NaHCO₃ on food intake, growth rate and acid-base balance in calves. **The Journal of Agricultural Science**, v. 88, n. 1, p. 1-9, 1977.

KENNELLY, J. J.; ROBINSON, B.; KHORASANI, G. R. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in early-lactation Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2486-2496, 1999.

KHAFIPOUR, E.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 1060-1070, 2009.

KHELIL-ARFA, H.; FAVERDIN, P.; BOUDON, A. Effect of ambient temperature and sodium bicarbonate supplementation on water and electrolyte balances in dry and lactating Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 4, p. 2305-2318, 2014.

KHORASANI, G. R.; KENNELLY, J. J. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in late-lactation Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 7, p. 1707-1716, 2001.

KILMER, L. H.; MULLER, L. D.; SNYDER, T. J. Addition of sodium-bicarbonate to rations of postpartum dairy-cows - physiological and metabolic effects. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 12, p. 2357-2369, 1981.

KILMER, L. H.; MULLER, L. D.; WANGSNESS, P. J. Addition of sodium bicarbonate to rations of pre-and postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 12, p. 2026-2036, 1980.

KLEEN, J. L.; HOOIJER, G. A.; REHAGE, J.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. **Journal of Veterinary Medicine A**, v. 50, p. 406-414, 2003.

KOHN, R. A.; DUNLAP, T. F. Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and in vitro. **Journal of Animal Science**, 76, n. 6, p. 1702-1709, 1998.

KRAUSE, K. M.; OETZEL, G. R. Inducing subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88 p. 3633-3639, 2005.

KRAUSE, K. M.; OETZEL, G. R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 3-4, p. 215-236, 2006.

KRONQVIST, C.; EMANUELSON, U.; SPORNDLY, R.; HOLTENIUS, K. Effects of prepartum dietary calcium level on calcium and magnesium metabolism in periparturient dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 3, p. 1365-1373, 2011.

KUNZELMANN, K.; MALL, M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 245-289, 2002.

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B.; VAN AMBURGH, M. E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 8, p. 2190-2196, 1998.

LEONHARD-MAREK, S.; MAREK, M.; MARTENS, H. Effect of transmural potential difference on Mg transport across rumen epithelium from four different breeds of sheep. **Journal of Agricultural Science**, 130, p. 241-247, Mar 1998.

LEONHARD-MAREK, S.; MARTENS, H. Effects of potassium on magnesium transport across rumen epithelium. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 271, n. 6, p. G1034-G1038, Dec 1996.

LEONHARD-MAREK, S.; STUMPF, F.; BRINKNANN, I.; BREVES, G.; MARTENS, H. Basolateral Mg²⁺/Na⁺ exchange regulates apical nonselective cation channel in sheep rumen epithelium via cytosolic Mg²⁺. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, n. 4, p. G630-G645, 2005.

LOCK, A. L.; ROVAI, M.; GIPSON, T. A.; de VETH, M. J.; BAUMAN, D. E. A conjugated linoleic acid supplement containing trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid

reduces milk fat synthesis in lactating goats. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 9, p. 3291-3299, 2008.

MARDEN, J. P.; JULIEN, C.; MONTEILS, V.; AUCLAIR, E.; MONCOULON, R.; BAYOURTHE, C. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows?. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 9, p. 3528-3535, 2008.

MARTENS, H.; GABEL, G. Transport of Na and Cl across the epithelium of ruminant forestomachs: rumen and omasum. A review. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 90, n. 4, p. 569-575, 1988.

MARTENS, H.; GABEL, G.; STROZYK, B. Mechanism of electrically silent Na and Cl transport across the rumen epithelium of sheep. **Experimental Physiology: Translation and Integration**, v. 76, n. 1, p. 103-114, 1991.

MARTENS, H.; KUBEL, O. W.; GABEL, G.; HONIG, H. Effects of low sodium-intake on magnesium-metabolism of sheep. **Journal of Agricultural Science**, 108, p. 237-243, Feb 1987.

MARTENS, H.; LEONHARD-MAREK, S.; RONTGEN, M.; STUMPF, F. Magnesium homeostasis in cattle: absorption and excretion. **Nutrition Research Reviews**, 31, n. 1, p. 114-130, Jun 2018.

MARTENS, H.; SCHWEIGEL, M. Pathophysiology of grass tetany and other hypomagnesemias: implications for clinical management. **Veterinary clinics of North America: Food animal practice**, v. 16, n. 2, p. 339-368, 2000.

MAYLAND, H. Grass tetany. In: CHURCH, D. C. **The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition**. ed. Prospect Heights, Illinois: Waveland Press, Inc, p. 511, 1988.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. Further elements of importance. In: **Principles of plant nutrition**. Springer, Dordrecht, p. 639-655, 2001.

METSON, A. J.; SAUNDERS, W. M.; COLLIE, T. W.; GRAHAM, V. W. Chemical composition of pastures in relation to grass tetany in beef breeding cows. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, 9, n. 2, p. 410-436, 1966.

MEYER, H.; BUSSE, F. W. Rectal absorption of magnesium in ruminants. Brief report. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 82, 140-141, 1975.

MERSMANN, H. J. Mechanisms for conjugated linoleic acid-mediated reduction in fat deposition, **Journal of Animal Science**, v. 80, p. E126-E134, 2002.

MILLER, W. J.; BRITTON, W. M.; ANSARI, M. S. Magnesium in livestock nutrition. In: JONES, J.B.; BLOUNT, M. C. JR.; WILKINSON, S. R.; REYNOLDS, G. A. **Magnesium in the Environment**. Taylor County Printing Co, Reynolds, Georgia, USA, p. 109-130, 1972.

MILLS, J. A. N.; FRANCE, J.; DIJKSTRA, J. A review of starch digestion in the lactating dairy cow and proposals for a mechanistic model: 2. Postruminal starch digestion and small intestinal glucose absorption. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 8, n. 4, p. 451-481, 1999.

MOORE, W. F.; FONTENOT, J. P.; TUCKER, R. E. Relative effects of different supplemental magnesium sources on apparent digestibility in steers. **Journal of Animal Science**, 33, n. 2, p. 502-506, 1971.

MORVAY, Y.; BANNINK, A.; FRANCE, J.; KEBREAB, E.; DIJKSTRA, J. Evaluation of models to predict the stoichiometry of volatile fatty acid profiles in rumen fluid of lactating holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 3063-3080, 2011.

MOULD, F. L.; ØRSKOV, E. R. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 1983.

MOURIÑO, F.; AKKARAWONGSA, R.; WEIMER, P. J. Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 4, p. 848-859, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2001. Nutrient requirements of dairy cattle: seventh revised edition, 2001.

NEIDERFER, K. P.; BARNARD, A. M.; MOYER, K. Z.; TRENCH, A. M.; TAYLOR, A. E.; CRONIN, S. K.; GRESSLEY, T. F. Effects of calcium carbonate, magnesium oxide and encapsulated sodium bicarbonate on measures of post-ruminal fermentation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, n. 3, p. 802-811, 2020.

NEVILLE, E. W.; FAHEY, A.G.; GATH, V. P.; MOLLOY, B. P. TAYLOR, S. J.; MULLIGAN, F. J. The effect of calcareous marine algae, with or without marine magnesium oxide, and sodium bicarbonate on rumen pH and milk production in mid-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 9, p. 8027-8039, 2019.

NEWTON, G. L.; FONTENOT, J. P.; TUCKER, R. E.; POLAN, C. E. Effects of high dietary potassium intake on the metabolism of magnesium by sheep. **Journal of Animal Science**, 35, n. 2, p. 440-445, Aug 1972.

NOCEK, J. E. Bovine acidosis: implications on laminitis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1005-1028, 1997.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 184-194, 2003.

OCKNER, R. K.; PITTMAN, J. P.; YAGER, J. L. Differences in the intestinal absorption of saturated and unsaturated long chain fatty acids. **Gastroenterology**, v. 62, n. 5, p. 981-992, 1972.

PEREIRA, M. N.; ARMENTANO, L. E. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets. II. Digestion and rumen function. **Journal of Dairy Science**, v. 83:2876-2887, 2000.

PEREIRA, M. N.; GARRETT, E. F.; OETZEL, G. R.; ARMENTANO, L. E. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets. I. Performance and health. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2716-2730, 1999.

PÉREZ-RUCHEL, A.; REPETTO, J. L.; CAJARVILLE, C. Use of NaHCO₃ and MgO as additives for sheep fed only pasture for a restricted period of time per day: effects on intake, digestion and the rumen environment. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1068-1074, 2014.

PETERS, J. P.; SHEN, R. Y. W.; ROBINSON, J. A. Disappearance of acetic acid from the bovine reticulorumen at basal and elevated concentrations of acetic acid. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 5, p. 1509-1517, 1992.

PETERSON, D. G.; MATITASHVILI, E. A.; BAUMAN, D. E. The inhibitory effect of trans-10, cis-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 10, p. 2523-2527, 2004.

PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O.; GOZHO, G. N.; MCBRIDE, B. W. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 21-31, 2008.

QIU, X.; EASTRIDGE, M. L.; GRISWOLD, K. E.; FIRKINS, J. L. Effects of substrate, passage rate, and pH in continuous culture on flows of conjugated linoleic acid and trans C18:1. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3473-3479, 2004.

RAZZAGHI, A.; MALEKKHAHI, M.; VALIZADEH, R. PARAND, E.; BAYAT, A. R. Modulation of ruminal pH, milk fat secretion, and biohydrogenation intermediates by alkalizing agents in dairy cows fed starch-rich diets. **Livestock Science**, v. 248, p. 104485, 2021.

RAZZAGHI, A.; VAKILI, A. R.; KHORRAMI, B.; GHAFARI, M. H.; RICO, D. E. Effect of dietary supplementation or cessation of magnesium-based alkalizers on milk fat output in dairy cows under milk fat depression conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 3, p. 2275-2287, 2022.

RAZZAGHI, A.; VALIZADEH R.; GHAFARI, M. H.; BRITO, A. F. Liquid molasses interacts with buffers to affect ruminal fermentation, milk fatty acid profile, and milk fat synthesis in dairy cows fed high-concentrate diets. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 5, p. 4327-4339, 2020.

REGO, O. A.; ROSA, H. J. D.; PORTUGAL, P.; CORDEIRO, R.; BORBA, A. E. S.; VOUZELA, C. M.; BESSA, R. J. B. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid, omega-3 and other fatty acids in milk fat from grazing dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 95, n. 1-2, p. 27-33, 2005.

RICO, D. E.; HARVATINE, K. J. Induction of and recovery from milk fat depression occurs progressively in dairy cows switched between diets that differ in fiber and oil concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6621-6630, 2013.

ROGERS, J. A.; DAVIS, C. L.; CLARK, J. H. Alteration of rumen fermentation, milk fat synthesis, and nutrient utilization with mineral salts in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 577-586, 1982.

ROGERS, J. A.; MARKS, B. C.; DAVIS, C. L.; CLARK, J. H. Alteration of rumen fermentation in steers by increasing rumen fluid dilution rate with mineral salts. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 10, p. 1599-1605, 1979.

ROGERS, J. A.; MULLER, L. D.; DAVIS, C. L.; CHALUPA, W.; KRONFELD, D. S.; KARCHER, L. F.; CUMMINGS, K. R. Response of dairy cows to sodium bicarbonate and limestone in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 646-660, 1985.

ROUFFET, J.; DALLE, M.; TOURNAIRE, C.; BARLET, J. P.; DELOST, P. Sodium intake by pregnant cows and plasma aldosterone and cortisol concentrations in the fetus during late pregnancy. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 7, p. 1762-1765, 1990.

RUSSELL, J. B. In: **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Department of Microbiology, Cornell University, 2002

RUSSELL, J. B.; CHOW, J. M. Another theory for the action of ruminal buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 3, p. 826-830, 1993.

RUSSELL, J. R.; YOUNG, A. W.; JORGENSEN, N. A. Effect of sodium bicarbonate and limestone additions to high grain diets on feedlot performance and ruminal and fecal parameters in finishing steers. **Journal of Animal Science**, v. 51, n. 4, p. 996-1002, 1980.

RUSSELL, J. R.; YOUNG, A. W.; JORGENSEN, N. A. Effect of dietary corn starch intake on pancreatic amylase and intestinal maltase and pH in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 5, p. 1177-1182, 1981

SANDLE, G. I. Salt and water absorption in the human colon: a modern appraisal. **Gut**, v. 43, n. 2, p. 294-299, 1998.

SCHAEFER, D. M.; WHEELER, L. J.; NOLLER, C. H.; KEYSER, R. B.; WHITE, J. L. Neutralization of acid in the rumen by magnesium oxide and magnesium carbonate. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 5, p. 732-739, 1982.

SCHWEIGEL, M.; MARTENS, H. Magnesium transport in the gastrointestinal tract. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, n. 3, p. D666-D677, 2000.

SCHWEIGEL, M.; PARK, H. S.; ETSCHMANN, B.; MARTENS, H. Characterization of the Na⁺-dependent Mg²⁺ transport in sheep ruminal epithelial cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 1, p. G56-G65, 2006.

SCHWEIGEL, M.; VOIGT, J.; MOHR, E. Indication of intracellular magnesium deficiency in lactating dairy cows revealed by magnesium loading and renal fractional excretion. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, n. 1, p. 105-112, 2009.

SHI, Y.; WEIMER, P. J. Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on ruminococcus flavefaciens FD-1 in cellulose-fed continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2583-2591, 1992.

SNYDER, T. J.; ROGERS, J. A.; MULLER L. D. Effect of 1,2% sodium bicarbonate with two ratios of corn silage:grain on milk production, rumen fermentation, and nutrient digestion by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 1290-1297, 1983.

STAPLES, C. R.; EMANUELE, S. M.; VENTURA, M.; BEEDE, D. K.; SCHRICKER, B. R. Effects of a new multielement buffer on production, ruminal environment, and blood minerals of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 6, p. 1573-1586, 1988.

STAPLES, C. R.; LOUGH, D. S. Efficacy of supplemental dietary neutralizing agents for lactating dairy cows. A review. **Animal Science and Technology**, v. 23, p. 277-303, 1989.

STEELE, W. Intestinal absorption of fatty acids, and blood lipid composition in sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 520-527, 1983.

STORRY, J.; ROOK, J.; Magnesium metabolism in the dairy cow V. Experimental observations with a purified diet low in magnesium. **The Journal of Agricultural Science**, 61, n. 2, p. 167-171, Dec 1963.

SUKHIJA, P. S.; PALMQUIST, D. L. Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 7, p. 1784-1787, 1990.

SHERWOOD, L.; KLANDORF, H.; YANCEY, P. H. Animal physiology from genes to organisms. 2013.

TEH, T. H.; HEMKEN, R. W.; HARMON, R. J. Dietary magnesium-oxide interactions with sodium-bicarbonate on cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, 68, n. 4, p. 881-890, 1985.

THIVIERGE, M. C.; CHOUINARD, P. Y.; LEVESQUE, J.; GIRARD, V.; SEOANE, J. R.; BRISSON, G. J. Effects of buffers on milk fatty acids and mammary arteriovenous differences in dairy cows fed Ca salts of fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 7, p. 2001-2010, 1998.

THOMAS, J. W.; EMERY, R.S; BREAU, J. K.; LIESMAN, J. S. Response of milking cows fed a high concentrate, low roughage diet plus sodium bicarbonate, magnesium oxide, or magnesium hydroxide. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 11, p. 2532-2545, 1984.

TOMAS, F. M.; POTTER, B. J. The effect and site of action of potassium upon magnesium absorption in sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 27, n. 6, p. 873-880, 1976.

TREFZ, F. M.; CONSTABLE, P. D.; LORENZ, I. Quantitative physicochemical analysis of acid-base balance and clinical utility of anion gap and strong ion gap in 806 neonatal calves with diarrhea. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 678-687, 2015.

TSIAMADIS, V.; BANOS, G.; PANOUSIS, N.; KRITSEPI-KONSTANTINO, M.; ARSENO, G.; VALERGAKIS, G. E. Genetic parameters of calcium, phosphorus, magnesium, and potassium serum concentrations during the first 8 days after calving in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, 99, n. 7, p. 5535-5544, Jul 2016.

WAGNER, K. M.; FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L.; HULL, B. L. Replacement of corn silage with wheat middlings and calcium chloride or sodium bicarbonate for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 564-574, 1993.

WEIMER, P. J. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster?. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 8, p. 1496-1502, 1996.

WEST, J. W.; COPPOCK, C. E.; NAVE, D. H.; LABORE, J. M.; GREENE, L. W.; ODON, T. W. Effects of potassium carbonate and sodium bicarbonate on rumen function in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 81-90, 1987.

WHEELER, W. E.; NOLLER, C. H. Gastrointestinal tract pH and starch in feces of ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 44, n. 1, p. 131-135, 1977.

WILSON, G. F.; REID, C. S. W.; MOLLOY, L. F.; METSON, A. J. BUTLER, G. W. Grass tetany. I. Influence of starch and peanut oil supplements on plasma magnesium, calcium, and phosphorus levels in grazing dairy cows. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, 12, n. 3, p. 467-488, 1969.

WOOLPERT, M. E.; DANN, H. M.; COTANCH, K. W.; MELILLI, C.; CHASE, L. E.; GRANT, R. J.; BARBANO, D. M. Management practices, physically effective fiber, and ether extract are related to bulk tank milk de novo fatty acid concentration on Holstein dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.100, p. 1-10, 2017.

WRIGHT, E. M. The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. **Annual Review of Physiology**, v. 55, n. 1, p. 575-589, 1993.

XIN, Z.; TUCKER, W.B.; HEMKEN, R.W. Effect of reactivity rate and particle size of magnesium oxide on magnesium availability, acid-base balance, mineral metabolism, and, milking performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 72, n. 2, p. 462-470, Feb 1989.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO - *EFFECT OF RUMEN NEUTRALIZERS ON DAIRY COWS BEFORE AND DURING A DIETARY STARCH CHALLENGE*

ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NORMA PARA SUBMISSÃO DO *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*

Abstract

A calcinated magnesium oxide was developed to be a persistent rumen neutralizer (pHix-Up). Our objective was to evaluate lactation performance, intake, diet digestibility, rumen pH and fermentation profile, jugular blood acid-base balance, and chewing behavior of cows fed either pHix-Up [PHP, 0.5% of dry matter (DM)], sodium bicarbonate (BIC, 1% of DM), or control (CTL). Fifteen Holstein cows (29.5 kg of milk/d, 620 kg, 193 days in milk) were individually fed a sequence of these 3 treatments in 5, 3 × 3 Latin squares, with 21-d periods. On day 17 of each period, feed was removed at 2100 h and dietary starch concentration was abruptly increased, on d 18 to 21, from 22.6 to 31.6% of DM by replacing citrus pulp with ensiled corn grain. A mean value per cow during d 14 to 17 of each period was obtained and data obtained during the induction of ruminal acidosis was analyzed as repeated measures over time. Models had the effects of cow, period, and treatment. Contrasts were: CTL vs PHP and BIC vs PHP. Before the induction of acidosis, PHP tended to increase milk fat concentration (3.81%) relative to CTL (3.63%) and BIC (3.65%). No differences were detected in milk yield (27.5 kg/d) and DM intake (22.6 kg/d). The PHP increased the secretions in milk (g/d) of unsaturated and oleic fatty acids relative to BIC. The total tract digestibility of EE tended to be higher on PHP than CTL (92.8 vs 91.5% of intake). The daily minimum reticular pH tended to be higher on PHP (5.90) than CTL (5.82). Relative to CTL, cows on PHP tended to spend less time ruminating per day (460 vs 489 min) and per unit of rumen pH (73 vs 78 min). Rumen microbial yield, evaluated by the daily excretion of allantoin in urine, was higher on BIC than PHP. Mean reticular pH (6.22 vs 6.28) and minimum pH (5.65 vs 5.81) were lower and daily duration ≤ 6.2 (703 vs 573 min) was higher on d 18 than d 19 to 21. The acetate to propionate ratio was 3.8 on d 17 and 2.7 on d 21. During the induction of acidosis, milk protein and casein concentrations tended to be increased by BIC relative to PHP (3.36 vs 3.30% and 2.63 vs 2.58%, respectively). Fecal pH was reduced during acidosis and was highest on PHP both before and during acidosis. PHP tended to increase mean reticular pH (6.29 vs 6.24) and to reduce the duration of pH ≤ 6.2 (555 vs 653 min/d) and increased minimum pH (5.84 vs 5.72) relative to BIC. PHP also tended to increase minimum pH relative to CTL (5.75). Jugular blood pH, HCO₃, and base excess were lower during than before acidosis and CTL tended to have lower blood HCO₃ than PHP. Blood Mg concentration was highest on PHP and BIC tended to have higher Na concentration than PHP. Daily milk fatty acid secretion and profile, milk yield, and DM intake during acidosis did not differ for the contrasts evaluated. Overall, PHP tended to

increase milk fat concentration, total tract EE digestibility, the secretion of preformed unsaturated fatty acids in milk fat, and minimum rumen pH of cows in late lactation. Rumen neutralizers improved blood buffering capacity and PHP resulted in higher reticular pH than BIC.

Key Words: acidosis, magnesium oxide, milk fat, rumen pH, sodium bicarbonate.

Introduction

The increase in dietary energy supply from rapidly fermentable carbohydrates can increase the fractional rate of rumen VFA production relative to the rate of clearance by rumen wall absorption or passage with the fluid phase to the omasum (Resende Júnior et al., 2006). Excessive ruminal VFA accumulation can induce ruminal and systemic acidosis in dairy cows (Aschenbach et al., 2011). Ruminal VFA accumulation, without adequate buffering, can decrease fluid pH and can have detrimental effects on rumen motility (Crichlow and Leek, 1986) and anatomy (Gaebel et al., 1989; Aschenbach et al., 2019), fiber digestion (Grant and Mertens, 1992), microbial yield (Hoover, 1986), and productivity (Kalscheur et al., 1997; Krause and Oetzel, 2005), intake (Nocek, 1997), and health (Plaizier et al., 2008) of dairy cows, and can affect chewing behavior (DeVries et al., 2009). Subacute ruminal acidosis is an important factor on animal welfare and economics related to lactation performance and herd turnover rate (Kleen et al., 2003).

The supplementation of dairy cows with rumen neutralizers, such as buffers and alkalizers, is a strategy to control ruminal pH, and has been extensively evaluated (Hu and Murphy, 2005; Rauch et al., 2012; Bach et al., 2018). However, the positive effect of sodium bicarbonate on feed intake and performance of dairy cows post-partum was associated to reduced rumen pH and increased VFA concentration, with no effect on diet digestibility (Rogers et al., 1985a). Sodium bicarbonate also induced acute increase in intake and milk yield of dairy cows in mid lactation, with no effect on rumen pH, fermentation profile, and total tract fiber digestibility (Pereira et al., 1999). These are suggestive that due to systemic action, rumen neutralizers may be an acute modulator of intake in dairy cows.

Rumen neutralizers supply cations such as Na^+ , as in sodium bicarbonate, or Mg^{++} , as in magnesium oxide. Cations can affect blood acid-base balance and intake of dairy cows (Stewart, 1983; Rogers et al., 1985a; Goff, 2018). The Dietary Cation-Anion

Difference (DCAD) has been calculated to evaluate the balance between positively and negatively charged macrominerals in the diet. Equations have been proposed to calculate DCAD and may use only Na^+ , K^+ and Cl^- (Hu and Murphy, 2004), or include S^{2-} (Block, 1984), or also include Mg^{2+} , Ca^{2+} , and P^{3-} (Goff, 2000). Sanchez et al. (1994) detected a quadratic effect of DCAD (Na, K, Cl) on milk yield and intake of dairy cows, with maximum response at + 38 mEq/100 g DM, based on 10 experiments with 326 cows. Similarly, Hu and Murphy (2004) also observed a quadratic effect of DCAD (Na, K, Cl) on milk yield and intake, and maximum responses at 34 and 40 mEq/100 g DM, respectively. Blood pH and HCO_3^- concentration followed the same quadratic trends and peaked at similar DCAD values as intake and milk yield. Based on these surveys of the literature (Sanchez et al., 1994; Hu and Murphy, 2004), extremely negative or positive DCAD diets reduce blood pH, HCO_3^- concentration, intake, and lactation performance. Excessively positive DCAD may induce blood hypoxia due to hypoventilation to retain CO_2 in order to reduce blood pH, and may cause intake depression by various mechanisms (Quintero et al., 2010). More recently, Iwaniuk and Erdman (2015) detected an exponential relationship between DCAD (Na, K, Cl, S) with intake and milk yield of dairy cows, with a plateau at DCAD greater than + 200 mEq/kg DM. In their review of published literature, a more positive DCAD during lactation was linearly associated to greater milk fat concentration and yield, ruminal pH and acetate to propionate ratio, and fiber digestibility. There was a linear relationship between DCAD and blood HCO_3^- and base excess of dairy cows in the experiment of Borucki Castro et al. (2004). On the opposite, negatively charged diets have negative effect on feed intake, as demonstrated by the reduction in feed intake induced by anionic salts pre-partum (Santos et al., 2019). Rumen neutralizer can also increase the osmolarity of ruminal contents, the intake of water, and the passage rate of the ruminal fluid phase (Rogers et al., 1985b), with potential effects on ruminal starch degradation, rumen VFA clearance, and the efficiency of microbial yield (Harrison et al., 1975; Russell and Chow, 1993).

Past studies have shown benefits to provide magnesium oxide-based products on milk yield (Razzaghi et al., 2021), milk fat (Razzaghi et al., 2022) and rumen pH (Erdman et al., 1982), although, magnesium oxide-based products might differ in reactivity (Eubank, 1951). The calcination process is an important step on magnesium oxide production (Bach et al., 2018), overheating the ore might decrease its reactivity and bioavailability (Goff, 2014). Moreover, the grinding process and the particle size resulted also might influence the animal response (Xin et al., 1989). Thus, evaluating the specific

magnesium oxide to be used is necessary. A rumen neutralizer was manufactured by changing the calcination temperature of magnesium oxide to achieve increased capacity to neutralize acids (pHix-UP). Based on preliminary studies described in Bach et al. (2018), the neutralizing capacity of pHix-Up was 38 mEq/g and sodium bicarbonate was 12 mEq/g, assessed in vitro as milliequivalents of protons from hydrochloric acid required to lower solution pH from 6.5 or 5.5 to 3.0. These authors (Bach et al., 2018) showed that cows fed diets with increasing concentrations of barley in replacement to forage in the diet maintained more stable and higher rumen pH with pHix-Up at 0.5% of DM than cows fed 1% of DM of sodium bicarbonate.

The objective of this experiment was to evaluate the effect of pHix-Up at 0.5% of diet DM relative to a control diet and to a diet with 1% of DM of sodium bicarbonate on lactation performance, feed intake, diet digestibility, rumen pH and fermentation profile, blood acid-base balance, and chewing behavior of dairy cows before and during the induction of ruminal acidosis. Our hypothesis was that based on the capacity to neutralize acids pHix-Up at 0.5% of DM would be more effective in improving ruminal pH and lactation performance than sodium bicarbonate at 1% of DM.

Materials and Methods

The experimental protocol was approved by the University of Lavras Bioethic Committee in Utilization of Animals (Protocol 015/2020).

Cows and treatments

The experiment was conducted in an open-walled, sand-bedded tie-stall barn with fans and high-pressure sprinklers during the dry-cool season of Southeast Brazil. Fifteen Holstein cows (193 ± 120 days in lactation at the beginning of the experiment, 3 primiparous) formed 5 Latin squares by parity (1 vs. >1) and milk yield during 7 d pre-blocking. Within a square, cows were randomly allocated to a sequence of 3 treatments in 3×3 Latin squares, with 21-d periods, and 13 d of adaptation to treatments. During the first 17 days of each period, cows were individually fed a low starch diet (Table 1) to evaluate the short-term response to the treatments under normal feeding management. Then, ruminal acidosis was imposed to each cow by removing feed at 2200 h of day 17 and *ad libitum* availability of a high starch diet (Table 1) at 0700 h during days 18 to 21. The starch content of the diet was increased by substitution of citrus pulp pellets by silage of ground and rehydrated corn grain, with no change in other feed ingredients. Treatments

were: a TMR with no supplementation (Control), a TMR supplemented with 1% of sodium bicarbonate (BIC), and a TMR supplemented with 0.5% of magnesium oxide (PHP. pHix-Up, Timab, France).

The TMR for each treatment was mixed in a 1.2 m³ stationary feed mixer (Unimix 1200. Casale, Brazil) and offered 1 ×/d at 0700 h. The daily feed refusal per cow during the experiment was 12.2 ± 6.6 % of offered on a DM basis and 13.4 ± 7.0 % of offered on an as-fed basis. Feed was pushed up at least 10 ×/d. The DM concentration of the whole plant corn silage, alfalfa haylage, and ensiled corn grain were monitored weekly with a microwave oven (by drying for 5 min and then in 3 min steps until a stable weight was obtained) and the TMR was adjusted accordingly.

Feed sampling and analysis

Daily samples of feed ingredients and orts per cow were collected from d 14 to 21 of each experimental period. Composite samples of feeds were formed per period and composite samples of orts were formed for days 14 to 16 of each period. Orts during days 18 to 21 of each period were analyzed per cow per day per period. Samples were dried in a forced-air oven at 55°C for 72 h and ground to pass a 1-mm screen (Wiley mill, Thomas Scientific, USA). The DM concentration was determined at 105°C for 24 h and ash was evaluated at 550°C for 8 h. The composition of the offered TMR in ingredients and the daily intake of DM were calculated. The nutrient composition of the consumed TMR before (d 14 to 17) and during (d 18 to 21) the induction of acidosis was calculated by the total nutrient intake of all cows on a treatment divided by the total DMI for the treatment during the same period. Samples were sent to a commercial laboratory (3rLab/Rock River Laboratories, Brazil) for determination of CP with a micro Kjeldhal steam distillator (method 990.03; AOAC International, 2006), NDF by filter bag (nonwoven textile; 100 g/m²) technique with heat-stable α-amylase and without sodium sulfite (ANKOM Technology, USA. Schlau et al., 2021), ether extract (method 2003.05; AOAC International, 2006), and starch plus free glucose with α-amylase and amyloglucosidase and colorimetry for glucose as described in Fernandes et al. (2022), adapted from Hall (2015). Samples of the ingredients were subjected to digestion in HCO₃ (70%) + H₂O₂ (30%) using a digestion block for mineral measurements according to the procedure described by Mills and Jones (1996). Concentrations of calcium, magnesium, phosphorus, potassium, sodium, and sulfur in the diet were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, Optima 4300DV, Perkin Elmer). Chloride in

TMR was determined by silver nitrate titration after extraction with 0.5% nitric acid. Two equations were used to calculate the DCAD of the diets. $DCAD\ 1 = (Na/23 + K/39.1) - (Cl/35.5 + S/32.1 \times 2)$ (Ender et al., 1962). $DCAD\ 2 = (Na/23 + K/39.1 + 0.15 \times Ca/40 \times 2 + 0.15 \times Mg/24 \times 2) - (Cl/35.5 + 0.25 \times S/32.1 \times 2 + 0.50 \times P/31 \times 3)$ (Goff, 2000).

Performance and milk composition

Cows were milked 2 ×/d starting at 0500 and 1600 h in an adjacent herringbone parlor. Milk yield was recorded daily throughout the experiment and the mean yield of days 14 to 17 was used to compare treatments before acidosis. During acidosis, milk yield of each day from d 18 to 21 was analyzed separately. Milk samples were obtained daily during d 15 to 21 in duplicate per cow per d and in proportion of the yield at each milking. Both samples were analyzed and the average result were used. Samples were stored in flasks containing 2-bromo-2-nitropropane-1-3-diol under refrigeration until shipment to the Laboratory of the Paraná State Holstein Breeders Association (APCBRH, Curitiba, Brazil). Milk components (crude protein, casein, fat, lactose, TS), urea-N, and the profile of fatty acids in milk fat were measured by mid-infrared analysis (Nexgen FTS/FCM; Bentley Instruments Inc., USA). Milk energy secretion (Mcal/d) was calculated (NRC, 2001): $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$. The secretion of ECM (kg/d) was calculated as: $\text{Milk energy secretion}/0.70$ (assumes 0.70 Mcal/kg of milk with 3.7% fat, 3.2% protein, and 4.6% lactose). The BCS (1 to 5, thin to fat) was the mean of two independent evaluators obtained on d 21. The BW was measured on d 16 to 21 immediately after the morning milking with an individual walk-over weigh scale (Eziweigh5. Tru-Test Brasil, Brazil).

Total tract digestibility, ruminal microbial yield, and fecal viscosity and pH

On d 14 to 16 of each experimental period, fecal and urinary excretions were manually collected in 3, 8-h collection periods, with 8-h intervals, and starting 8 h later on each consecutive day, to represent a 24-h collection. Feces and urine were collected in buckets; for every 2 cows, 1 researcher stood behind them for 8 h and collected any fecal and urine excretion into the bucket. Fecal samples were immediately weighed and sub-samples (1% of defecation) were frozen throughout the collection period to provide a composite per cow per period. The sample was dried at 55°C for 72 h. The concentrations of DM, NDF, ash, ether extract, and starch were measured, as previously described for feed analysis. The total tract apparent digestibilities of DM, OM, NDF, ether extract, starch, and the non-NDF OM were calculated. Digestible OM intake (**DOMI**) was

estimated (OM intake \times OM digestibility) and the ECM/DOMI ratio was calculated as a measure of digestible energy efficiency. Urine composite samples were formed by collecting 3% of urination volume kept under refrigeration throughout the collection period. Period composites from each cow were mixed with 4% sulfuric acid solution (5 mL urine and 20 mL acid) and frozen for allantoin determination. The daily excretion of allantoin was determined in urine and used as a relative measure of ruminal microbial yield (Valadares et al., 1999; Pereira et al., 2021). Allantoin was analyzed according to Chen and Gomes (1992). The relative efficiency of ruminal microbial growth was estimated as allantoin/DOMI (mmol/kg).

Additional spot fecal samples were collected from each cow 12 h after morning feeding on d 20. Fecal samples were frozen at -20°C until viscosity and pH measurements. Briefly, fecal samples were thawed overnight, homogenized, and two subsamples of fresh feces were obtained. A subsample (100 g) used to measure fecal viscosity was diluted with 120 mL of distilled water. The solution was homogenized for 30 s and filtered through two layers of cheesecloth. The viscosity of the filtered solution was measured with a rotational viscosimeter (Model DV-E; Brookfield Engineering Laboratories, USA) at 100 rpm with spindle LV-1 and temperature of 24°C . Another subsample (15 g) was diluted with 100 mL of distilled water, homogenized for 30 s, and the pH was measured with a pH meter probe (pHmetro Digimed DM 20. Digicrom Analítica, Brazil).

Ruminal fermentation

Ruminal fluid samples were obtained on d 17 and 21 with a flexible oro-gastric tube at 11.3 ± 0.4 h after feeding, with the goal of having minimum saliva contamination. Cows were randomly sampled within squares. Samples were strained and frozen in liquid nitrogen to suppress fermentation before storage at -20°C until VFA analysis. After thawing, samples were centrifuged at 4°C at $8,855 \times g$ for 15 min. The supernatant was analyzed for VFA by gas-liquid chromatography (CP 3800 Gas Chromatography Varian. Varian Chromatography Systems, USA), with a capillary column [CP-Wax 58 (FFAP) CB. Varian Analytical Instruments, USA]. A rumen sample was mixed to a 36% formaldehyde solution for total protozoa counting. Samples were stained according to Dehority (1984) and total protozoa was enumerated with an optical microscope in a Neubauer chamber (Warner, 1962).

Ruminal pH probes with base station and repeater (Models US-3046 and US-4046. Smaxtec, Austria) were inserted into the reticulum of each cow 1 d before the

initiation of the experiment. The pH data were generated at 10-min intervals and was downloaded at the end of each experimental period. Data from d 14 to 21 of each period were used for treatment comparisons. Daily rumen pH data from d 14 to 16 were averaged per cow to represent rumen fermentation before acidosis and data per cow per d was used to evaluate rumen pH from d 18 to 21 during acidosis.

Blood sampling

Blood serum samples from the coccygeal vessels were collected on d 16 at 0700 h, immediately before feeding, for calcium, magnesium, and sodium analysis. Samples were analyzed in a commercial laboratory (Laboratório Santa Cecília, Brazil) with an AU480 analyzer (Beckman Coulter, São Paulo, Brazil). The jugular blood acid-base balance was evaluated on d 17 and 18, 6 h after morning feeding with a Cobas b 121 blood gas analyzer (Roche Diagnóstica Brasil Ltda, São Paulo, Brazil). Jugular blood samples were collected in heparinized vacuum tubes, within a 30 min period, at random within square, and were kept on ice from sampling to analysis. Samples were analyzed within less than 1 h of sampling. Coccygeal blood samples were also obtained on d 17 to 21, 10 h after morning feeding with tubes with a clot activator plus gel for haptoglobin evaluation (Cooke and Arthington, 2012) and on d 17 to 19, at the same sampling times, with tubes containing potassium fluoride and EDTA for D-lactate analysis (D-lactate Colorimetric Assay Kit, MAK058, Sigma-Aldrich, USA).

Chewing

During d 16, 18, 19, and 20 of each period, rumination and eating behaviors were monitored by visual observation at 5-min intervals continuously for 24 h/d as in Pereira et al. (1999). Buccal activities were: rumination, eating, drinking, and idleness. Eating, rumination, and chewing (eating + rumination) were calculated (min/d and min/kg DMI). Rumination time (min/d) per unit of mean rumen pH during the day of chewing measurement was calculated.

Individual feeding observations were combined and separated into meals using a meal criterion (i.e., the minimum duration of time between meals) calculated for each cow. Meal criteria were calculated for each cow using methods described by DeVries et al. (2003); in summary, a software package (MIX 3.1.3; MacDonald and Green, 1988) was used to fit normal distributions to the frequency of \log_{10} -transformed intervals of time between recorded eating observations. If the interval of time between 2 recorded observations of eating exceeded the determined meal criterion, this was classified as a

different meal. The number of different meals in a day was termed meal frequency (meals/d). Total meal time (min/d) was the total eating time (eating observations/d \times 5 min), plus all the non-feeding intervals shorter than the length of the meal criterion of each cow. Meal duration (min/meal) was calculated as the total daily meal time divided by the meal frequency. Finally, meal size was the ratio between daily DMI (kg/d) and meals/d. The duration, size, and time post-feeding of the longest daily meal was calculated, as well as time post-feeding (min) and the duration of the longest meal interval. The duration of the first daily meal was measured with a stopwatch. Five evaluators observed the behavior of all cows, individually, after offering feed at 0700 h until the last cow finished its first meal.

Particle size sorting behavior during the day was evaluated with the Penn State Particle Separator (Lammers et al., 1996) with the 19- and 8-mm diameter screens and pan. The particle distribution and weight of the offered TMR and available orts of each cow was measured at 0700 (at feeding immediately after morning milking), 1230, 1830, and 0500 h (during morning milking). The predicted intake (as-fed basis) of particles on each screen was: % TMR retained on screen \times kg of TMR consumed. The observed intake of particles was: % TMR retained on screen \times kg of TMR offered - % orts retained on screen \times kg of orts. The selection index (Leonardi and Armentano, 2003) was: $100 \times$ (observed intake/predicted intake). Sorting values below 100% represent selective refusal, above 100% represent preferential intake, and equal to 100% represent no selection. The proportion of daily DMI in the morning (0700 to 1230 h), afternoon (1230 to 1830 h), and night (1830 to 0700 h) were determined.

Statistical Analysis

Data were analyzed with the MIXED procedure of SAS (SAS Institute, Cary, NC). Degrees of freedom were calculated using the Kenward-Roger option. Normality of the residuals were evaluated using the Shapiro-Wilk statistic and normal probability plots with the UNIVARIATE procedure. The contrasts evaluated were: CTL vs PHP, and BIC vs PHP. Significance was declared at $P \leq 0.05$ and tendencies at $P \leq 0.10$.

Data obtained before the acidosis challenge (d 14 to 17) generated a mean value per cow and were analyzed with Model 1: random effect of cow (1 to 15), fixed effect of period (1 to 3), and fixed effect of treatment (CTL, PHP, BIC).

Data obtained during the acidosis challenge (d 18 to 21) were analyzed with a repeated measures approach with Model 2: random effect of cow (1 to 15), fixed effect

of period (1 to 3), fixed effect of treatment (CTL, PHP, BIC), fixed effect of day (18, 19, 20, 21), and the interaction between treatment and day. The interaction between cow, period, and treatment was the error term for the treatment effect. The best covariance structure was defined by the Bayesian information criterion among first order autoregressive, compound symmetry, and unstructured. Treatment means on each day of acidosis challenge were compared with the slice option.

Results and Discussion

Diets

Treatment diets had similar concentration in DM of forages, whole cottonseeds, and protein concentrates (Table 1). As planned, during the induction of ruminal acidosis ensiled corn grain totally replaced citrus pulp in the diet, increasing starch concentration from 22.6 to 31.6% of DM and reducing non-starch

NFC from 12.8 to 5.6% of DM, on average, without inducing major changes in NDF and NFC concentrations in the diet. In diet PHP, Mg concentration was 0.45% of DM, and in BIC Na was 0.35% of DM, based on an animal response expectation (NASEM, 2021). Concentrations of Mg and Na in the other diets were 0.20 and 0.12% of DM, respectively. The replacement of citrus pulp with corn during the induction of acidosis reduced the concentrations of Ca and K and increased P, reducing diet DCAD. The estimated diet DCAD varied depending on the equation used for calculation. Based on the DCAD equation of Ender et al. (1962), using Na, K, Cl, and S (DCAD 1), treatment BIC had higher DCAD (+ 225 mEq/kg DM) than CTL and PHP (+ 120 mEq/kg DM). When the equation of Goff (2000) based on all 7 macrominerals was used (DCAD 2), DCAD was (mEq/kg DM): + 104 for CTL, + 137 for PHP, and + 212 for BIC before acidosis, and + 56 for CTL, + 81 for PHP, and + 163 for BIC during acidosis. Based on DCAD, diet BIC would be the most capable of increasing milk and fat yield, DMI, rumen pH, and fiber digestibility (Iwaniuk and Erdman, 2015).

Reticulo-rumen pH

The abrupt increase in rapidly fermentable starch in the diet following feed restriction at night was effective ($P \leq 0.05$) in reducing blood pH (7.401 vs 7.412) and buffering capacity of late lactation dairy cows (Table 2). The increase in dietary starch reduced ($P \leq 0.01$) the ruminal acetate to propionate ratio evaluated 3.5 d after diet change (2.7 vs 3.8), independently of treatment (Table 2). Feed restriction on d 17 reduced daily

DMI to 64.4% and increased DMI during the first day on the high starch diet (d 18) by 7.2% of the mean DMI before acidosis (Figure 1). Reticular pH measured at 10-min intervals had circadian rhythm typical of dairy cattle fed on TMR (Pereira and Armentano, 2000) and minimum pH occurred around 10 to 12 h post-morning feeding in all treatments (Figures 2 and 3). The day of induction of acidosis affected fluid pH (Table 3) and pH nadir was lower on d 18 than on d 19 to 21 (Figure 3). There were tendencies ($P \leq 0.09$) for cows fed PHP to have higher minimum pH than CTL, both before and during acidosis (Table 3). During the induction of ruminal acidosis, PHP also tended ($P \leq 0.08$) to increase mean pH and the duration of $\text{pH} \leq 6.2$ and increased ($P = 0.03$) minimum pH relative to BIC. Daily DMI of cows fed PHP did not differ ($P \geq 0.15$) from CTL and BIC before (Table 4) and during (Table 5) acidosis. This data is suggestive that the neutralizing capacity of the PHP diet was higher than BIC, as was planned experimentally, and in agreement with other *in vivo* observation of rumen pH of dairy cows fed the same treatments of this experiment and also subjected to ruminal acidosis (Bach et al., 2018). Bach et al. (2022) observed that pHix-Up at 0.25% of diet DM was more effective in maintaining rumen pH and DMI when forage was reduced in the diet of dairy cows than Na bicarbonate at 0.82% of DM.

Feces

Fecal pH was reduced ($P < 0.01$) during acidosis (Table 2), probably reflecting the increase in the flow of fermentable starch for intestinal fermentation (Neubauer et al., 2020). Fecal ash content was highest on PHP and, relative to CTL, cows fed PHP had ($P = 0.03$) feces with lower viscosity and with a tendency ($P = 0.09$) for lower DM concentration. Lowered fecal DM concentration has been reported for cows fed neutralizing agents, particularly MgO (Erdman et al., 1982). Cows fed PHP had higher ($P < 0.01$) fecal pH than BIC and CTL, before and during acidosis, supporting the concept that MgO can increase the pH of the digesta throughout the entire digestive tract (Erdman et al., 1980, 1982; Christiansen and Webb, 1990). Schaefer et al. (1982) observed that heifers supplemented with 50 or 100 g/d of MgO had decreased fecal consistency and increased fecal pH than non-supplemented heifers. A better control of intestinal acidity with MgO can be potentially favorable to intestinal integrity and animal health (Aschenbach et al., 2019), although it has not been thoroughly evaluated.

Lactation performance and milk fat

Treatment diets had no effect ($P \geq 0.21$) on DMI (22.6 kg/d), milk yield (27.5 kg/d), and feed efficiency before the induction of ruminal acidosis (Table 4). However, there was a tendency ($P \leq 0.10$) for cows fed PHP to have higher milk fat concentration (3.81%) than CTL (3.63%) and BIC (3.65%). The increase in milk fat induced by PHP was associated to increased ($P \leq 0.05$) secretions of monounsaturated, unsaturated, and oleic fatty acids in milk relative to BIC (Table 6). Tendencies ($P \leq 0.10$) were also detected for PHP to increase the concentrations in milk fat of these same unsaturated fatty acids and to reduce saturated fatty acids relative to CTL and BIC (Table 6). Although a reduction in ruminal lipid biohydrogenation intermediates, as the result of increased rumen pH, could increase De novo fatty acid synthesis in the mammary gland and milk fat content (Kalscheur et al., 1997; Razzaghi et al., 2022), this mode of action could not be supported by the milk fatty acid secretion and profile in our experiment (Tables 6 and 7). A possible mode of action for the increase in milk fat of cows fed PHP may have involved the ruminal formation of Mg salts of unsaturated fatty acids at high fluid pH (Sukhija and Palmquist, 1990), capable of increasing the flow of unsaturated fatty acids for intestinal absorption (Jenkins and Palmquist, 1984). Interestingly, PHP was not effective in increasing milk fat and did not induce changes in milk fatty acids during the induction of acidosis (Tables 5 and 7), possibly due a reduction in ruminal soap formation at low fluid pH (Sukhija and Palmquist, 1990). Unsaturated fatty acids have higher digestibility than saturated fatty acids (Boerman et al., 2015; NASEM, 2021). Cows fed PHP had a tendency ($P = 0.10$) to have higher ether extract digestibility than cows fed CTL (92.8 vs 91.5% of intake) (Table 8). Unsaturated fatty acids can also increase the solubility of saturated fatty acids by facilitating their transfer to the micelles (Freeman, 1969) and their uptake and re-esterification by the enterocytes (Ockner et al., 1972), probably explaining the tendency ($P = 0.08$) for the increase in the concentration of stearic acid in milk fat of cows fed PHP relative to CTL (Tables 6 and 7). Since lipid intestinal digestibility may be reduced at high lipid intake (Palmquist, 1991), the evaluation of MgO supplementation to diets with high lipid content may deserve further evaluation as a strategy to increase fatty acid digestibility and milk fat secretion.

Digestibility and rumen fermentation

The absence of treatment effects on the total-tract digestibility of NDF (Table 8), in spite of the positive effect of PHP on reticular pH, suggests that the positive effect of PHP on milk fat was not driven by increased fiber digestibility. Treatments also had no effect ($P \geq 0.11$) on rumen VFA profile (Table 2), except for a tendency ($P = 0.08$) for

greater isobutyrate molar proportion with PHP than CTL, probably as a result of increased valine deamination to the branched chain VFA (Apajalahti et al., 2019) at high fluid pH (Lana et al., 1998). However, there is no consensus in the literature for the effect of rumen neutralizers on ruminal branched chain VFA (Arambel et al., 1988; Qiu et al., 2004; Razzaghi et al., 2021).

A decrease in the molar proportion of propionate (Razzaghi et al., 2021), and increases in acetate (Erdman et al., 1982) and in the acetate to propionate ratio would be expected outcomes of MgO supplementation. Differences among experiments on rumen fermentation profile in response to rumen neutralizers may be explained by the variation among experiments in the amount and type of starch supplementation (Harrison et al., 1975; Erdman et al., 1982; Ewing et al., 1986; Christiansen and Webb, 1990; Allen, 1997). Treatment diets had no effect on plasma D-lactate concentration before and during acidosis (Table 3). In our experiment, rumen neutralizers had minor effect on reticulo-rumen VFA profile.

Rumen microbial yield and milk protein

Sodium bicarbonate increased rumen microbial yield and efficiency relative to PHP ($P < 0.01$) and no difference ($P = 0.90$) was detected between PHP and CTL (Table 8). Cows fed BIC also excreted more urine (20.9 L/d) than cows fed PHP (16.9 L/d) and there was a tendency for PHP to increase urine excretion relative to CTL (15.5 L/d). Both rumen neutralizers increased urination and the increases relative to CTL were + 9% for PHP and + 34.8% for BIC. Although free water intake was not evaluated, the increase in urine excretion suggests that cows fed neutralizing agents consumed more water (Khelil-Arfa et al., 2014). Erdman et al. (1982) also reported increased urine volume when dairy cows were fed Na bicarbonate at 1% of DM and MgO at 0.8 % of DM. The increase in urine excretion suggests that cows fed BIC had greater environment and manure management impact than PHP and CTL.

Increased water intake might have increased the rumen fluid phase turnover rate (Russel and Chow, 1993) and increased the efficiency of rumen microbial synthesis (Harrison et al., 1975) of cows fed BIC. The daily excretion of fresh feces did not differ ($P \geq 0.30$) by treatment (Table 8). The increase in rumen microbial yield of cows fed BIC did not affect diet digestibility (Table 8). There was no evidence of a negative effect of a plausibly faster fluid phase fractional passage rate of cows fed BIC on the digestibilities

of OM, starch, or NDF. Milk urea-N (Tables 4 and 5) and the intake of energy, evaluated as DOMI (Table 8), did not differ ($P \geq 0.20$) by treatment.

During the induction of ruminal acidosis, cows fed BIC tended ($P = 0.07$) to have higher daily yields of protein and casein than cows fed PHP, and PHP did not differ ($P \geq 0.23$) from CTL (Table 5). The positive effect of BIC on rumen microbial yield (Table 8) may explain the positive effect of BIC on milk protein secretion during acidosis. A faster ruminal passage rate could also increase the proportion of consumed starch digested post-ruminally and the flow of absorbable glucose, potentially increasing milk protein secretion (McCarthy et al., 1989). Interestingly is the occurrence of a positive response in milk protein secretion to BIC only when the high starch diet was fed, suggesting that greater rumen microbial yield increased milk protein secretion only when energy from starch was added to the diet.

Although there was no effect of the contrasts evaluated ($P \geq 0.15$) on DMI during acidosis (Table 5), DMI was + 1.6 kg/d higher for cows fed BIC than CTL ($P = 0.02$). The DMI of cows fed PHP was numerically intermediate to CTL and BIC, and did not differ statistically. Cows fed BIC apparently did not drop DMI on d 19 as did cows on CTL and PHP, and at d 21 the DMI of PHP and BIC were similar, and both were higher than CTL (Figure 1). In some reports, MgO supplementation had no effect on DMI and milk yield of dairy cows (Erdman et al., 1980, 1982; Arambel et al., 1988; Razzaghi et al., 2022), but greater milk yield at the same DMI has been observed (Razzaghi et al., 2021). The interaction between diet composition and rumen neutralizer supplementation has been described for a long time (Erdman 1988; Hu and Murphy, 2005). On a high starch diet, the positive effect on DMI of dairy cows of Na bicarbonate supplementation was proportionally larger than on high fiber diets, and the positive effect of Na bicarbonate on DMI was detected with 1 d of supplementation (Pereira et al., 1999), suggesting a systemic fast-acting mechanism. The effect of treatments on DMI during acidosis numerically followed the DCAD 2 value of the diets (Goff, 2000), suggesting that this equation would be more adequate than the Ender et al. (1962) equation based only on Na, K, Cl, and S to predict the effect of ions on DMI.

Blood minerals

Cows fed PHP had higher ($P < 0.01$) Mg concentration in blood serum 16 d from the start of the supplementation than cows fed CTL and BIC (Table 9), demonstrating the capacity of MgO to supply absorbable cations. Blood Mg concentration was at acceptable

levels in all treatments (≥ 2.39 mg/dL), assuming the recommended concentration of 1.9 to 2.4 mg/dL for dairy cows (Goff, 2018). Diets CTL and BIC with 0.2% Mg in DM were apparently adequate to meet the animal requirement, based on blood serum concentration. Treatment PHP induced a + 8.3% increase in serum Mg concentration relative to the mean of CTL and BIC. There was no evidence for a favorable effect of the increase in serum Mg concentration on blood Ca of these late lactation Holsteins (Table 9).

Differently from Mg, the tendency ($P = 0.08$) of increase in blood Na induced by BIC was of much lower magnitude (+ 0,5% relative to PHP) (Table 9). Blood serum Na concentration was apparently more subjected to short-term control than blood Mg concentration. Blood Na concentration has urine excretion as a major regulator (Kilmer et al., 1981; Hu and Murphy, 2004; Perez-Ruchel et al., 2014). Blood Na normally does not change when Na bicarbonate is supplemented to dairy cows (Emery et al., 1964; Erdman et al., 1980; Kilmer et al., 1981). In the meta-analysis of Hu and Murphy (2004), diet Na concentration did not affect blood Na, which ranged from 123.75 to 161.50 mEq/L (mean of 140.75 mEq/L), similar to our mean value of 138.44 mEq/L (Table 9).

Blood acid-base balance

Cows fed PHP had higher ($P = 0.03$) pCO₂ and tended ($P \leq 0.09$) to have greater HCO₃⁻ and base excess than CTL (Table 2), denoting more blood buffering capacity, and did not differ from BIC. Blood pH was tightly regulated and was not affected by treatment. Xin et al. (1989) showed that only very reactive MgO sources increased pCO₂ of dairy cows, reflecting blood HCO₃⁻ concentration (Jones, 2010). According to Goff (2018), any ion reaching the blood may alter blood acid-base balance, the bioavailability of Mg in MgO sources may need to be considered on diet DCAD calculations. Blood buffering capacity of pHix-Up at 0.5% of DM was similar to Na bicarbonate at 1% of DM.

Eating and rumination

The effect of rumen neutralizers on meal behavior before (Table 10) and during (Table 11) acidosis was minor. There were tendencies ($P \leq 0.10$) for cows fed PHP to have lower meal time per d than cows fed CTL, both before and during acidosis, with no difference ($P \geq 0.16$) from BIC. During acidosis cows fed PHP also tended ($P = 0.10$) to have lower daily eating time than CTL and tended ($P = 0.08$) to have shorter duration of the first daily meal than BIC. Meal frequency, size, and duration did not differ by

treatment. Sodium bicarbonate and MgO supplementation had no effect on meal size and frequency of cows subjected to ruminal acidosis (Bach et al., 2018), similar to our results.

Rumination time per d tended ($P = 0.06$) to be reduced and total chewing time was reduced ($P = 0.01$) on cows fed PHP relative to CTL, and did not differ ($P \geq 0.18$) from BIC (Table 10). The ratio of rumination time to rumen pH also tended ($P = 0.06$) to be lower for PHP than CTL, and did not differ from BIC ($P = 0.50$), suggesting that rumen neutralizers induced a reduction in rumination time per unit of pH, independently of NDF digestibility (Table 8). During acidosis, rumination time per DMI also tended ($P = 0.08$) to be lower on PHP than CTL and did not differ ($P = 0.64$) from BIC.

The proportion of intake during the day was affected by treatment diets both before (Table 10) and during (Table 11) acidosis. Before acidosis, cows fed PHP tended ($P = 0.10$) to have lower proportion of daily intake at night than CTL and during acidosis PHP induced ($P \leq 0.03$) lower proportion of daily intake at night than CTL and BIC. Cows fed PHP during acidosis also tended ($P = 0.06$) to consume a greater proportion of daily intake in the morning than CTL and consumed ($P < 0.01$) a greater proportion of daily intake in the afternoon than BIC. The difference among periods of the day in the proportion of daily intake was smallest for CTL and both rumen neutralizers were associated with greater proportion of intake in the morning and less at night.

Before acidosis, there was no treatment effect ($P \geq 0.12$) on particle size sorting behavior in any of the 3 periods of the day (Table 10). However, treatments affect particle size sorting during acidosis (Table 11). During acidosis, cows fed PHP refused (93%) particles > 19 mm and cows fed CTL selected in favor (105%) of long particles in the morning ($P = 0.03$), suggesting that the larger proportion of intake in the morning with PHP may have been associated with smaller particle size of the consumed diet than CTL, at least in the morning. There was no treatment effect ($P \geq 0.18$) on particle size sorting behavior in the afternoon and night. Cows with propensity to ruminal acidosis selected more in favor of long particles and against short particles when exposed to an acidosis challenge (DeVries et al., 2008). The refusal of long particles may be related to the lower rumination of cows fed PHP.

Effect of acidosis over time

Figures 1, 5, 6 and 7 show the effect of day relative to the acidosis induction protocol on selected variables. The reduction in feed intake overnight on d 17 (Figure 1) reduced BW after morning milking and ECM in d 18 only (Figure 5). The effect of day

of acidosis was significant ($P < 0.01$) for all milk solid components concentration and daily yield, except ($P = 0.54$) for milk protein concentration (Table 5). There were no interactions between treatment and day of acidosis ($P \geq 0.13$) for variables describing lactation performance.

Eating and rumination behaviors were affected by day of acidosis (Table 11). During the first day of feeding the high starch diet following overnight feed restriction (d 18), cows had longer first meal duration, meal time, and eating time, associated to less rumination per d and per DMI (Figure 6), and greater proportion of daily intake in the morning and reduced proportion at night (Figure 7) than on d 19 and 20, explaining the lowest pH during d 18 (Figure 3). Ruminations were restored to normal levels on d 19, but meal frequency was increased and meal size was reduced only on d 20. Selection in favor of long feed particles (> 19 mm) and against short particles (< 8 mm) occurred before acidosis and during d 20. Although experimental induction of acidosis have induced preferential consumption of long feed particles (DeVries et al., 2008; Maulfair et al., 2013), the cows apparently took more than 2 d to change eating behavior in favor of more frequent, shorter, and smaller meals and selection in favor of long particles and against short particles in response to the induction of ruminal acidosis in our experiment. The increase in rumination during acidosis occurred 1 d before changes could be observed in meal behavior and sorting for long particles.

Serum haptoglobin concentration, before the acidosis challenge, was greater for PHP in comparison with CTL (1.03 vs. 1.44 mg/dL, $P = 0.04$) (Figure 4). During the acidosis there was not an effect of the day relative to acidosis on serum haptoglobin concentration, moreover, there was not a treatment effect. Different from our study, magnesium oxide supplementation at increasing doses (0.25, 0.5, 0.75% of DM) tended to decrease linearly the plasma haptoglobin concentration (Colombo et al., 2022).

Conclusions

Greater milk fat concentration and secretion of unsaturated fatty acids in cows fed PHP in late lactation was associated to increased total tract lipid digestibility and rumen pH, suggestive of a positive effect of MgO on fatty acid availability to the mammary gland. Rumen neutralizers increased blood buffering capacity during acidosis and PHP at 0.5% of DM induced higher rumen pH than Na bicarbonate at 1% of DM.

Acknowledgments

The authors are grateful to Timac Agro (Porto Alegre, Brazil) for partially funding this work, the CNPq (National Research Council, Brasilia, Brazil) for grants to the authors, and to the members of Grupo do Leite of the University of Lavras for the help in data collection and animal care.

References

- Allen, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J. Dairy Sci.* 80:1447-1462. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76074-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76074-0).
- AOAC International. 2006. Official Methods of Analysis. 18th ed. AOAC International, Arlington, Va.
- Apajalahti, J., K. Vienola, K. Raatikainen, V. Holder, and C. A. Moran. 2019. Conversion of branched-chain amino acids to corresponding isoacids- an in vitro tool for estimating ruminal protein degradability. *Front. Vet. Sci.* <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00311>.
- Arambel, M. J., R. D. Wiedmeier, D. H. Clark, R. C. Lamb, R. L. Boman, and J. L. Walters. 1988. Effect of sodium bicarbonate and magnesium oxide in an alfalfa-based total mixed ration fed to early lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 71:159-163. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79537-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79537-5).
- Aschenbach, J. R., G. B. Penner, F. Stumpff, and G. Gabel. 2011. Ruminant nutrition symposium: role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J. Anim. Sci.* 89:1092-1107. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3301>.
- Aschenbach, J. R., Q. Zebeli, A. K. Patra, G. Greco, S. Amasheh, and G. B. Penner. 2019. Symposium review: The importance of the ruminal epithelial barrier for a healthy and productive cow. *J. Dairy Sci.* 102:1866-1882. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15243>.
- Bach, A., Baudon, M., Elcoso, G., and Courillon, A. 2022. Effects on rumen pH and feed intake of a dietary concentrate challenge in cows fed rations containing pH modulators with different neutralizing capacity.
- Bach, A., I. Guasch, G. Elcoso, J. Duclos, and H. Khelil-Arfa. 2018. Modulation of rumen pH by sodium bicarbonate and a blend of different sources of magnesium oxide in lactating dairy cows submitted to a concentrate challenge. *J. Dairy Sci.* 101:9777-9788. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14353>.
- Block, E. 1984. Manipulating dietary anions and cations for prepartum dairy cows to reduce incidence of milk fever. *J. Dairy Sci.* 67:2939-2948. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81657-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81657-4).
- Boerman, J. P., J. L. Firkins, N. R. St-Pierre, and A. L. Lock. 2015. Intestinal digestibility of long-chain fatty acids in lactating dairy cows: A meta-analysis and meta-regression. *J. Dairy Sci.* 98:8889-8903. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9592>.

Borucki Castro, S. I., L. E. Phiiiip, V. Girard, and A. Tremblay. 2004. Altering dietary cation-anion difference in lactating dairy cows to reduce phosphorus excretion to the environment. *J. Dairy Sci.* 87:1751-1757. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73330-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73330-5).

Chen, X. B., and M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. *Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ.* Rowett Research Institute, Aberdeen, UK.

Christiansen, M. L., and K. E. Webb. 1990. Intestinal acid flow, dry matter, starch and protein digestibility and amino acid absorption in beef cattle fed a high-concentrate diet with defluorinated rock phosphate, limestone or magnesium oxide. *J. Anim. Sci.* 68:2105-2118. <https://doi.org/10.2527/1990.6872105x>.

Cooke, R. F., and J. D. Arthington. 2012. Concentrations of haptoglobin in bovine plasma determined by ELISA or a colorimetric method based on peroxidase activity. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97:531-536. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01298.x>.

Colombo, E. A., R. F. Cooke, A.C. R. Araújo, K. M. Harvey, K. G. Pohler, and A. P. Brandão. 2022. Supplementing a blend of magnesium oxide to feedlot cattle: effects on ruminal physiological, and productive responses. *J. Anim. Sci.* <https://doi.org/10.1093/jas/skab375>.

Crichlow, E. C., and B. F. Leek. 1986. Forestomach epithelial receptor activation by ruminal fluids from sheep given intraruminal infusions of volatile fatty acids. *Am. J. Vet. Res.* 47:1015-1018.

Dehority, B. A. 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:182-185. <https://doi.org/10.1128/aem.48.1.182-185.1984>.

DeVries, T. J., F. Dohme, and K. A. Beauchemin. 2008. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: feed sorting. *J. Dairy Sci.* 91:3958-3967. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1347>.

DeVries, T. J., K. A. Beauchemin, F. Dohme, and K. S. Schwartzkopf-Genswein. 2009. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: feeding, ruminating, and lying behavior. *J. Dairy Sci.* 92:5067-5078. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2102>.

DeVries, T. J., M. A. G. Von KeyserlInk, D. M. Weary, and K. A. Beauchemin. 2003. Measuring the feeding behavior of lactating dairy cows in early to peak lactation. *J. Dairy Sci.* 86:3354-3361. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73938-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73938-1).

Emery, R. S., L. D. Brown, and J. W. Thomas. 1964. Effect of sodium and calcium carbonates on milk production and composition of milk blood and rumen contents of cows fed grain ad libitum with restricted roughage. *J. Dairy Sci.* 47:1325-1329. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(64\)88913-x](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(64)88913-x).

- Ender, F., I. W. Dishington, and A. Helgebostad. 1962. Parturient paresis and related forms of hypocalcemic disorders induced experimentally in dairy cows. *Acta Vet. Scand.* 3:5-52.
- Erdman, R. A. 1988. Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: A review. *J. Dairy Sci.* 71:3246-3266. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79930-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79930-0).
- Erdman, R. A., R. L. Botts, R. W. Hemken, and L. S. Bull. 1980. Effect of dietary-sodium bicarbonate and magnesium-oxide on production and physiology in early lactation. *J. Dairy Sci.* 63:923-930. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)83027-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83027-X).
- Erdman, R. A., R. W. Hemken, and L. S. Bull. 1982. Dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide for early postpartum lactating dairy cows: effects on production, acid-base metabolism, and digestion. *J. Dairy Sci.* 65:712-731. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82259-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82259-5).
- Eubank, W. R. 1951. Calcination studies of magnesium oxides. *J. Am. Ceram. Soc.* 34:225-229. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1951.tb11644.x>.
- Ewing, D. L., D. E. Johnson, and W. V. Rumppler. 1986. Corn particle passage and size reduction in the rumen of beef steers. *J. Anim. Sci.* 63:1509-1515. <https://doi.org/10.2527/jas1986.6351509x>.
- Fernandes, T., K. T. da Silva, B. F. Carvalho, R. F. Schwan, R. A. N. Pereira, M. N. Pereira, and C. L. S. Ávila. 2022. Effect of amylases and storage length on losses, nutritional value, fermentation, and microbiology of silages of corn and sorghum kernels. *Anim. Feed Sci. Technol.* 285:115227. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115227>.
- Freeman, C. P. 1969. Properties of fatty acids in dispersions of emulsified lipid and bile salt and the significance of these properties in fat absorption in the pig and the sheep. *Br. J. Nutr.* 23:249-263. <https://doi.org/10.1079/bjn19690032>.
- Gaebel, G., M. Bell, and H. Martens. 1989. The effect of low mucosal pH on sodium and chloride movement across the isolated rumen mucosa of sheep. *Q. J. Exp. Physiol.* 74:35-44. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1989.sp003237>.
- Goff, J. P. 2000. Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16:319-337. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30108-0](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30108-0).
- Goff, J. P. 2014. Calcium and magnesium disorders. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 30:359-381. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.04.003>.
- Goff, J. P. 2018. Invited review: mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. *J. Dairy Sci.* 101:2763-2813. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13112>.
- Grant, R. J., and D. R. Mertens. 1992. Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. *J. Dairy Sci.* 75:2762-2768. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(92\)78039-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(92)78039-4).

Hall, M. B. 2015. Determination of dietary starch, in animal feeds and pet food by and enzymatic-colorimetric method: collaborative study. *J. AOAC Int.* 98:397-409. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-012>.

Harrison, D. G., D. E. Beever, D. J. Thomson, and D. F. Osbourn. 1975. Manipulation of rumen fermentation in sheep by increasing the rate of flow of water from the rumen. *J. Agric. Sci.* 85:93-101. <https://doi.org/10.1017/S0021859600053454>.

Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69:2755-2766. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80724-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80724-X).

Hu, W., and M. R. Murphy. 2004. Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 87:2222-2229. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70042-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70042-9).

Hu, W., and M. R. Murphy. 2005. Statistical evaluation of early- and mid-lactation dairy cow responses to dietary sodium bicarbonate addition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119:43-54. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.12.005>.

Iwaniuk, M. E., and R. A. Erdman. 2015. Intake, milk production, ruminal, and feed efficiency responses to dietary cation-anion difference by lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:1-13. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9949>.

Jenkins, T. C., and D. L. Palmquist. 1984. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *J. Dairy Sci.* 67:978-986. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81396-x](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81396-x).

Jones, M. B. 2010. Basic interpretation of metabolic acidosis. *Crit. Care Nurse.* 30:63-69. <https://doi.org/10.4037/ccn2010521>.

Kalscheur, K. F., B. B. Teter, L. S. Piperova, and R. A. Erdman. 1997. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2104-2114. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76156-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76156-3).

Khelil-Arfa, H., P. Faverdin, and A. Boudon. 2014. Effect of ambient temperature and sodium bicarbonate supplementation on water and electrolyte balances in dry and lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 97:2305-2318. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7079>.

Kilmer, L. H., L. D. Muller, and T. J. Snyder. 1981. Addition of sodium-bicarbonate to rations of postpartum dairy-cows - physiological and metabolic effects. *J. Dairy Sci.* 64:2357-2369. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(81\)82858-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(81)82858-5).

Klenn, J. L., G. A. Hooijer, J. Rehage, and J. P. T. M. Noordhuizen. 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *J. Vet. Med. A.* 50:406-414. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2003.00569.x>

Krause, K. M., and G. R. Oetzel. 2005. Inducing subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:3633-3639. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022\(05\)73048-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022(05)73048-4).

Lammers, B. P., D. R. Buckmaster, and A. J. Heinrichs. 1996. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 79:922-928. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76442-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76442-1).

Lana, R. P., J. B. Russell, and M. E. Van Amburgh. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim. Sci.* 76:2190-2196. <https://doi.org/10.2527/1998.7682190x>.

Leonardi C., and L. E. Armentano. 2003. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:557-564. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73634-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73634-0).

MacDonald, P. D. M., and P. E. J. Green. 1988. User's Guide to Program MIX: An interactive program for fitting mixtures of distributions. Release 2.3, January 1988. Ichthus Data Systems, Hamilton, Ontario, Canada.

Maulfair, D. D., and A. J. Heinrichs. 2013. Effects of varying forage particle size and fermentation carbohydrates on feed sorting, ruminal fermentation, and milk and component yields of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:3085-3097. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6048>.

McCarthy, R. D., T. H. Klusmeyer, J. L. Vicini, J. H. Clark, and D. R. Nelson. 1989. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 72:2002-2016. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79324-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79324-3).

Mills, H. A., and J. B. Jones Jr. 1996. Plant analysis handbook II: A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. Micro-Macro Publishing Inc.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (NASSEM). 2021. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25806>.

National Research Council (NRC). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Neubauer, V., R. M. Petri, E. Humer, I. Kroger, N. Reisinger, W. Baumgartner, M. Wagner, and Q. Zebeli. 2020. Starch-rich diet induced rumen acidosis and hindgut dysbiosis in dairy cows of different lactations. *Animals.* 10:1727. <https://doi.org/10.3390/ani10101727>.

Nocek, J. E. 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80:1005-1028. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76026-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76026-0).

Ockner, R. K., J. P. Pittman, and J. L. Yager. 1972. Differences in the intestinal absorption of saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Gastroenterology.* 62:981-992. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(72\)80115-x](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(72)80115-x).

- Palmquist, D. L. 1991. Influence of Source and amount of dietary fat on digestibility in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 74:1354-1360. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78290-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78290-8).
- Pereira, M. N., N. N. Morais Júnior, R. Caputo Oliveira, G. G. S. Salvati, and R. A. N. Pereira. 2021. Methionine precursor effects on lactation performance of dairy cows fed raw or heated soybeans. *J. Dairy Sci.* 104:2996-3007. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18696>.
- Pereira, M. N., L. E. Armentano. 2000. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets. II. Digestion and rumen function. *J. Dairy Sci.* 83:2876-2887. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75188-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75188-5).
- Pereira, M. N., E. F. Garrett, G. R. Oetzel, and L. E. Armentano. 1999. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets. I. Performance and Health. *J. Dairy Sci.* 82:2716-2730. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(99\)75528-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(99)75528-1).
- Pérez-Ruchel, A., J. L. Repetto, and C. Cajarville. 2014. Use of NaHCO₃ and MgO as additives for sheep fed only pasture for a restricted period of time per day: effects on intake, digestion and the rumen environment. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 98:1068-1074. <https://doi.org/10.1111/jpn.12173>.
- Plaizier, J. C., D. O. Krause, G. N. Gozho, and B. W. McBride. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* 176:21-31. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.016>.
- Qiu, X., M. L. Eastridge, K. E. Griswold, and J. L. Firkins. 2004. Effects of substrate, passage rate, and pH in continuous culture on flows of conjugated linoleic acid and trans C18:1. *J. Dairy Sci.* 87:3473-3479. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73482-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73482-7).
- Quintero, P., F. I. Milagro, J. Campi3n, and J. A. Mat3nez. 2010. Impact of oxygen availability on body weight management. *Med. Hypotheses.* 74:901-907. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.10.022>.
- Rauch, R. E., P. H. Robinson, and L. J. Erasmus. 2012. Effects of sodium bicarbonate and calcium magnesium carbonate supplementation on performance of high producing dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 177:180-193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.08.016>.
- Razzaghi, A., M. Malekkhahi, R. Valizadeh, E. Parand, and A. R. Bayat. 2021. Modulation of ruminal pH, milk fat secretion, and biohydrogenation intermediates by alkalizing agents in dairy cows fed starch-rich diets. *Livest. Sci.* 248:104485-104493. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104485>.
- Razzaghi, A., A. R. Vakili, B. Khorrami, M. H. Ghaffari, and D. E. Rico. 2022. Effect of dietary supplementation or cessation of magnesium-based alkalizers on milk fat output in dairy cows under milk fat depression conditions. *J. Dairy Sci.* 105:2275-2287. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20457>.

- Resende Júnior, J. C., M. N. Pereira, H. Bôer, and S. Tamminga. 2006. Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. *J. Dairy Sci.* 89:3096-3106. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72584-x](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72584-x).
- Rogers, J. A., L. D. Muller, C. L. Davis, W. Chalupa, D. S. Kronfeld, L. F. Karcher, and K. R. Cummings. 1985a. Response of dairy cows to sodium bicarbonate and limestone in early lactation. *J. Dairy Sci.* 68: 646-660. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80871-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80871-7).
- Rogers, J. A., L. D. Muller, T. J. Snyder, and T. L. Maddox. 1985b. Milk production, nutrient digestion, and rate of digesta passage in dairy cows fed long or chopped alfalfa hay supplemented with sodium bicarbonate. *J. Dairy Sci.* 68:868-880. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80904-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80904-8).
- Russell, J. B., and J. M. Chow. 1993. Another theory for the action of ruminal buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production. *J. Dairy Sci.* 76:826-830. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77407-x](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77407-x).
- Sanchez, W. K., D. K. Beede, and M. A. Delorenzo. 1994. Macromineral element interrelationships and lactational performance: empirical models from a large data set. *J. Dairy Sci.* 77:3096-3110. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77252-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77252-0).
- Santos, J. E. P., I. J. Lean, H. Golder, and E. Block. 2019. Meta-analysis of the effects of parturition dietary cation-anion difference on performance and health of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102:2134-2154. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14628>.
- Schaefer, D. M., L. J. Wheeler, C. H. Noller, R. B. Keyser, and J. L. White. 1982. Neutralization of acid in the rumen by magnesium oxide and magnesium carbonate. *J. Dairy Sci.* 65:732-739. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82260-1](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82260-1).
- Schlau, N., D. R. Mertens, K. Taysom, and D. Taysom. 2021. Technical note: effects of filter bags on neutral detergent fiber recovery and fiber digestion in vitro. *J. Dairy Sci.* 104:1846-1854. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18731>.
- Stewart, P. A. 1983. Modern quantitative acid-base chemistry. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 12:1444-1461. <https://doi.org/10.1139/y83-207>.
- Sukhija, P. S., and D. L. Palmquist. 1990. Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. *J. Dairy Sci.* 73:1784-1787. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78858-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78858-3).
- Valadares, R. F. D., G. A. Broderick, S. C. Valadares Filho, and M. K. Clayton. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J. Dairy Sci.* 82:2686-2696. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(99\)75525-6](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(99)75525-6).
- Warner, A. C. 1962. Enumeration of rumen microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 28:119-128. <https://doi.org/10.1099/00221287-28-1-119>.

Xin, Z., W. B. Tucker, and R. W. Hemken. 1989. Effect of reactivity rate and particle size of magnesium oxide on magnesium availability, acid-base balance, mineral metabolism, and milking performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:462-470. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79128-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79128-1).

Tables and Figures

Table 1. Ingredient and nutrient composition and particle size distribution of experimental diets before¹ and during² the acidosis challenge

Item	Before			During		
	CTL ³	PHP	BIC	CTL	PHP	BIC
Ingredients, % of DM						
Corn silage	36.5	36.6	36.7	36.6	36.6	36.7
Alfalfa haylage	9.3	9.3	9.3	9.4	9.4	9.4
Whole cottonseeds	11.6	11.5	11.5	11.6	11.6	11.6
Rehydrated and ensiled corn grain	14.5	14.5	14.5	27.5	26.9	26.4
Citrus pulp	13.3	12.8	12.2			
Soybean meal	11.0	11.0	11.0	11.1	11.1	11.1
Distillers dried grains ⁴	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
Sodium bicarbonate			1.0			1.0
pHix-Up		0.5			0.5	
Minerals and vitamins ⁵	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Nutrients, % of DM						
CP	17.1	17.0	17.0	17.3	17.3	17.3
NDF	36.2	36.1	36.3	34.8	34.8	35.0
Ether extract	4.2	4.2	4.2	4.5	4.4	4.4
Ash	6.8	7.3	7.4	6.1	6.6	6.8
NFC ⁶	35.7	35.4	35.1	37.3	36.9	36.6
Starch	22.7	22.6	22.5	32.1	31.6	31.1
Non-starch NFC	13.0	12.8	12.6	6.1	5.3	5.5
Ca	0.86	0.86	0.80	0.62	0.62	0.57
P	0.42	0.42	0.40	0.44	0.44	0.42
Mg	0.20	0.45	0.20	0.20	0.45	0.20
K	1.17	1.17	1.17	1.09	1.09	1.09
S	0.20	0.20	0.19	0.20	0.20	0.20
Cl	0.34	0.35	0.32	0.34	0.35	0.32
Na	0.12	0.13	0.35	0.12	0.12	0.35
DCAD 1, ⁷ mEq/kg DM	131	133	239	111	105	212
DCAD 2, ⁷ mEq/kg DM	104	137	212	56	81	163
DM, % of as-fed	46.2	46.4	45.9	44.5	44.6	44.5
Particle distribution,⁸ % of as-fed						
> 19 mm	27.3 ± 2.8	28.6 ± 2.7	29.5 ± 2.6	25.4 ± 3.7	25.4 ± 3.9	25.6 ± 3.3
8 – 19 mm	36.7 ± 2.7	36.6 ± 1.5	35.7 ± 1.8	38.2 ± 2.2	38.4 ± 2.5	38.1 ± 2.6
< 8 mm	36.0 ± 0.9	34.8 ± 1.4	34.8 ± 0.9	36.4 ± 2.7	36.2 ± 2.1	36.4 ± 2.1

¹D 14 to 17 of period.

²D 18 to 21 of period.

³CTL = Control; PHP = pHix-Up; BIC = Sodium bicarbonate.

⁴FlexyPro.

⁵21.8% Ca, 8.0% P, 6.2% Na, 1.5% Mg, 1.0% S, 44 mg/kg Co, 580 mg/kg Cu, 1,449 mg/kg Mn, 3,448 mg/kg Zn, 25 mg/kg Se, 58 mg/kg I, 290 KIU/kg vitamin A, 64 KIU/kg vitamin D, 1,800 IU/kg vitamin E.

⁶NFC = 100 – (CP + NDF + ether extract + ash).

⁷DCAD 1 = (Na/23 + K/39.1) - (Cl/35.5 + S/32.1 × 2) (Ender et al., 1962)

DCAD 2 = (Na/23 + K/39.1 + 0.15 × Ca/40 × 2 + 0.15 × Mg/24 × 2) - (Cl/35.5 + 0.25 × S/32.1 × 2 + 0.50 × P/31 × 3) (Goff, 2000)

⁸Penn State Particle Separator. Mean ± SD of 9 samples/treatment before the acidosis challenge and 27 samples/treatment during the acidosis challenge.

Table 2. Ruminal volatile fatty acids (VFA) molar proportions, protozoa concentration, jugular blood acid-base balance, and fecal variables before¹ and during² the acidosis challenge

	Before			During			SEM	<i>P</i> -value			
	CTL ³	PHP	BIC	CTL	PHP	BIC		Day	Treat×Day	CTL vs. PHP	BIC vs. PHP
Rumen											
% of total VFA											
Acetate	67.9	68.2	67.9	61.0	61.7	61.9	0.73	< 0.01	0.87	0.38	0.95
Propionate	18.6	18.0	18.2	25.5	24.5	23.6	0.85	< 0.01	0.73	0.48	0.78
Butyrate	9.8	10.1	10.0	9.2	9.3	10.0	0.38	0.17	0.62	0.65	0.56
Isobutyrate	0.82	0.85	0.82	0.92	0.98	0.93	0.024	< 0.01	0.84	0.08	0.11
Isovalerate	1.59	1.59	1.59	1.87	2.05	1.88	0.063	< 0.01	0.40	0.16	0.18
Valerate	1.28	1.22	1.22	1.57	1.49	1.44	0.037	< 0.01	0.67	0.16	0.50
Acetate/Propionate	3.71	3.83	3.76	2.61	2.72	2.82	0.146	< 0.01	0.81	0.28	0.90
Protozoa, × 10 ⁵ /mL	2.67	3.14	2.61	1.88	1.79	2.13	0.219	< 0.01	0.38	0.52	0.76
Blood											
pCO ₂ , mmHg	41.7	43.7	42.9	40.4	41.1	41.5	0.56	0.01	0.69	0.03	0.78
pO ₂ , mm Hg	41.5	38.2	49.8	43.6	41.8	42.2	3.00	0.86	0.36	0.54	0.16
pH	7.413	7.409	7.415	7.399	7.402	7.402	0.0050	0.05	0.86	0.90	0.62
HCO ₃ ⁻ , mM	26.0	27.0	26.9	24.4	25.0	25.2	0.36	< 0.01	0.91	0.09	0.89
Total CO ₂ , mM	27.3	28.3	28.2	25.7	26.3	26.5	0.37	< 0.01	0.88	0.08	0.92
Base excess, mM	1.3	2.0	2.1	-0.3	0.2	0.4	0.37	< 0.01	0.97	0.17	0.83
SatO ₂ , ⁴ %	76.7	72.2	76.0	76.0	76.3	76.0	1.93	0.52	0.50	0.24	0.35
Feces											
Viscosity, cP 100 ⁵	13.56	11.42	13.66	17.28	12.41	14.73	1.163	0.17	0.66	0.03	0.15
DM, % of fresh	12.00	11.24	11.34	12.07	11.66	12.05	0.321	0.06	0.47	0.09	0.47
Ash, % of DM	14.35	15.44	13.66	13.33	13.69	11.86	0.448	< 0.01	0.66	0.06	< 0.01
pH	7.70	8.15	7.74	7.29	7.77	7.40	0.037	< 0.01	0.83	< 0.01	< 0.01

¹Rumen and blood = d 17 of period. Feces = d 14 to 16 of period.²Rumen = d 21 of period. Blood = d 18 of period. Feces = d 20 of period.³CTL = Control; PHP = pHix-Up; BIC = Sodium bicarbonate.⁴Oxygen saturation, % of oxygen based on total hemoglobin saturation capacity.⁵Viscosity measured in centiPoise at 100 rotations/min.

Table 3. Rumen pH and plasma D-lactate concentration before¹ and during² the acidosis challenge

	Treatments				<i>P</i> -value			
	CTL ³	PHP	BIC	SEM	Day	Treat×Day	CTL vs. PHP	BIC vs. PHP
Before								
Mean pH	6.29	6.29	6.30	0.047			0.84	0.55
Minimum pH	5.82	5.90	5.87	0.055			0.07	0.55
Maximum pH	6.69	6.69	6.73	0.060			0.96	0.24
pH range	0.88	0.80	0.86	0.048			0.17	0.29
pH ≤ 6.2, min/d	549	522	500	83.8			0.61	0.68
pH ≤ 5.8, min/d	34	45	49	16.6			0.56	0.84
D-lactate, mM	0.394	0.385	0.332	0.0414			0.80	0.24
During								
Mean pH	6.27	6.29	6.24	0.049	< 0.01	0.68	0.41	0.08
Minimum pH	5.75	5.84	5.72	0.050	< 0.01	0.74	0.09	0.03
Maximum pH	6.77	6.76	6.74	0.056	< 0.01	0.98	0.62	0.66
pH range	1.02	0.92	1.02	0.045	< 0.01	0.87	0.08	0.08
pH ≤ 6.2, min/d	609	555	653	78.1	< 0.01	0.85	0.30	0.07
pH ≤ 5.8, min/d	90	69	117	31.7	< 0.01	0.55	0.59	0.22
D-lactate, mM	0.318	0.328	0.339	0.0222	0.04	0.26	0.27	0.99

¹Rumen pH = mean of d 14 to 16 of period. Plasma D-lactate = d 17 of period.

²Rumen pH = d 18 to 21 of period. Plasma D-lactate = d 18 and 19 of period.

³CTL = Control; PHP = pHix-Up; BIC = Sodium bicarbonate.

Table 4. Intake, lactation performance, MUN, feed efficiencies, BCS and BW before¹ the acidosis challenge

	Treatments			SEM	P-value	
	CTL ²	PHP	BIC		CTL vs. PHP	BIC vs. PHP
kg/d						
DMI	22.9	22.3	22.6	0.75	0.21	0.51
Milk	28.0	27.4	27.0	1.09	0.28	0.59
ECM	27.7	27.7	26.9	0.93	0.98	0.27
Fat	1.010	1.031	0.984	0.0387	0.51	0.15
Protein	0.942	0.908	0.915	0.0305	0.11	0.73
Casein	0.737	0.709	0.715	0.0258	0.11	0.73
Lactose	1.242	1.203	1.195	0.0540	0.22	0.82
Total solids	3.455	3.396	3.346	0.1200	0.46	0.55
% of milk						
Fat	3.63	3.81	3.65	0.118	0.06	0.10
Protein	3.37	3.36	3.40	0.070	0.90	0.19
Casein	2.63	2.62	2.66	0.060	0.81	0.18
Lactose	4.41	4.41	4.41	0.043	0.77	0.84
Total solids	12.34	12.52	12.40	0.177	0.12	0.33
MUN, mg/dL	10.94	11.53	10.98	0.613	0.20	0.24
Milk/DMI	1.23	1.23	1.20	0.047	0.96	0.37
ECM/DMI	1.22	1.24	1.20	0.034	0.45	0.21
BCS, 1-5	2.91	2.92	2.95	0.054	0.77	0.28
BW, kg	644	646	648	16.1	0.54	0.73

¹DMI = d 14 to 16 of period. Milk yield = d 14 to 17 of period. Milk components = d 15 to 17 of period. BCS = d 21 of period. BW = d 16 and 17 of period.

²CTL = Control; PHP = pHix-Up; BIC = Sodium bicarbonate.

Table 5. Intake, lactation performance, MUN, feed efficiencies, and BW during¹ the acidosis challenge

	Treatments			SEM	Day	Treat×Day	P-value	
	CTL ²	PHP	BIC				CTL vs. PHP	BIC vs. PHP
kg/d								
DMI	22.1	22.8	23.7	0.76	< 0.01	0.20	0.27	0.15
Milk	26.3	26.1	26.4	0.96	< 0.01	0.47	0.81	0.61
ECM	26.2	26.0	26.5	0.85	< 0.01	0.46	0.78	0.37
Fat	0.968	0.967	0.982	0.0380	< 0.01	0.24	0.96	0.58
Protein	0.867	0.854	0.879	0.0229	< 0.01	0.45	0.43	0.15
Casein	0.676	0.668	0.690	0.0200	< 0.01	0.27	0.59	0.17
Lactose	1.154	1.151	1.175	0.0462	< 0.01	0.52	0.94	0.43
Total solids	3.233	3.214	3.284	0.1030	< 0.01	0.58	0.79	0.35
% of milk								
Fat	3.67	3.72	3.71	0.112	< 0.01	0.23	0.54	0.98
Protein	3.34	3.30	3.36	0.073	0.54	0.28	0.23	0.07
Casein	2.60	2.58	2.63	0.063	< 0.01	0.13	0.56	0.07
Lactose	4.41	4.41	4.44	0.044	< 0.01	0.51	0.87	0.20
Total solids	12.39	12.37	12.43	0.170	< 0.01	0.55	0.78	0.44
MUN, mg/dL	11.70	11.41	10.92	0.703	< 0.01	0.95	0.61	0.39
Milk/DMI	1.21	1.17	1.13	0.044	< 0.01	0.99	0.24	0.36
ECM/DMI	1.20	1.16	1.14	0.037	< 0.01	0.47	0.37	0.75
BW, kg	636	640	640	15.9	< 0.01	0.37	0.21	0.91

¹D 18 to 21 of period.²CTL = Control; PHP = pHix-Up; BIC = Sodium bicarbonate.

Table 6. Milk fatty acids before¹ the acidosis challenge

	Treatments			SEM	P-value	
	CTL ²	PHP	BIC		CTL vs. PHP	BIC vs. PHP
g/d						
Preformed ³	443.5	454.3	430.7	14.88	0.49	0.14
Mixed ⁴	414.5	425.3	409.7	17.86	0.46	0.30
De novo ⁵	248.5	254.8	239.6	12.12	0.53	0.15
Monounsaturated	243.8	255.8	234.4	9.65	0.24	0.05
Polyunsaturated	16.0	16.4	16.0	1.95	0.79	0.77
Saturated	780.1	795.7	757.4	32.77	0.56	0.17
Unsaturated	261.1	275.5	251.4	11.36	0.22	0.05
Stearic	114.3	121.1	113.1	4.62	0.17	0.12
Oleic	179.5	189.7	172.2	7.71	0.20	0.04
g/100 g fatty acids						
Preformed	40.27	40.19	40.03	0.493	0.70	0.49
Mixed	37.39	37.49	37.78	0.396	0.65	0.17
De novo	22.33	22.33	22.18	0.506	0.98	0.61
Monounsaturated	23.38	24.03	23.33	0.703	0.08	0.07
Polyunsaturated	1.46	1.51	1.55	0.171	0.66	0.72
Saturated	75.04	74.15	74.95	0.798	0.06	0.10
Unsaturated	24.96	25.85	25.05	0.798	0.06	0.10
Stearic	10.99	11.35	11.20	0.269	0.08	0.46
Oleic	17.27	17.87	17.23	0.689	0.08	0.07

¹Mean value of d 15 to 17 of period.

²CTL = Control; PHP = pHix-Up; BIC = Sodium bicarbonate.

³Fatty acids \geq 18 carbons.

⁴Fatty acids with 16 or 17 carbons.

⁵Fatty acids with 4 to 15 carbons.

Table 7 Milk fatty acids during¹ the acidosis challenge

	Treatments				SEM	Day	Treat×Day	P-value	
	CTL ²	PHP	BIC					CTL vs. PHP	BIC vs. PHP
g/d									
Preformed ³	429.8	431.2	434.4	13.67	< 0.01	0.56	0.92	0.81	
Mixed ⁴	401.3	402.8	411.6	17.94	< 0.01	0.74	0.91	0.51	
De novo ⁵	240.4	232.8	241.1	11.64	< 0.01	0.87	0.38	0.34	
Monounsaturated	240.2	241.6	241.2	7.97	0.57	0.61	0.86	0.96	
Polyunsaturated	15.9	15.8	17.6	1.89	0.12	0.99	0.89	0.15	
Saturated	746.0	739.4	756.4	32.29	< 0.01	0.75	0.77	0.47	
Unsaturated	256.4	259.0	259.1	9.32	0.52	0.60	0.76	0.99	
Stearic	111.0	113.3	114.2	4.10	< 0.01	0.51	0.60	0.83	
Oleic	178.4	179.5	176.7	6.62	< 0.01	0.69	0.87	0.67	
g/100 g fatty acids									
Preformed	40.53	40.51	40.17	0.504	< 0.01	0.54	0.91	0.16	
Mixed	37.35	37.73	37.71	0.385	< 0.01	0.78	0.18	0.95	
Denovo	22.13	21.78	22.10	0.482	< 0.01	0.45	0.26	0.32	
Monounsaturated	24.29	24.36	23.97	0.772	< 0.01	0.80	0.85	0.32	
Polyunsaturated	1.48	1.57	1.72	0.174	< 0.01	0.91	0.47	0.21	
Saturated	74.19	73.92	74.25	0.847	< 0.01	0.71	0.50	0.42	
Unsaturated	25.81	26.08	25.75	0.847	< 0.01	0.71	0.50	0.42	
Stearic	11.25	11.41	11.25	0.293	< 0.01	0.08	0.62	0.64	
Oleic	18.17	18.12	17.67	0.747	< 0.01	0.77	0.88	0.22	

¹D 18 to 21 of period.²CTL = Control; PHP = pHix-Up; BIC = Sodium bicarbonate.³Fatty acids ≥ 18 carbons.⁴Fatty acids with 16 or 17 carbons.⁵Fatty acids with 4 to 15 carbons.

Table 8. Total-tract apparent digestibility, digestible OM intake (DOMI), ECM over DOMI; urinary allantoin excretion (Alla), Alla over DOMI, daily urine and fresh fecal excretion before¹ the acidosis challenge

	Treatments			SEM	<i>P</i> -value	
	CTL ²	PHP	BIC		CTL vs. PHP	BIC vs. PHP
Digestibility, % of intake						
DM	70.85	71.42	72.09	1.046	0.63	0.57
OM	73.24	73.91	73.98	0.959	0.53	0.95
NDF	52.81	53.95	54.18	1.768	0.57	0.91
Non-NDF OM	86.18	86.62	86.64	0.576	0.52	0.98
Starch	97.44	97.87	97.56	0.268	0.26	0.43
Ether extract	91.51	92.81	92.02	0.587	0.10	0.34
DOMI, kg/d	15.5	15.2	15.5	0.48	0.57	0.58
ECM/DOMI	1.79	1.82	1.75	0.060	0.62	0.34
Alla, mmol/d	398	395	458	17.9	0.90	< 0.01
Alla/DOMI, mmol/kg	26.1	26.1	29.7	1.18	0.99	0.02
Urine, L/d	15.5	16.9	20.9	0.94	0.06	< 0.01
Feces, kg/d	55.3	57.3	55.6	2.89	0.30	0.38

¹D 14 to 16 of period²CTL = Control; PHP = pHix-Up; BIC = Sodium bicarbonate.

Table 9. Calcium, magnesium and sodium in blood serum before¹ the acidosis challenge

	Treatments			SEM	<i>P</i> -value	
	CTL ²	PHP	BIC		CTL vs. PHP	BIC vs. PHP
Ca, mg/dL	9.32	9.27	9.38	0.085	0.55	0.21
Mg, mg/dL	2.39	2.60	2.41	0.047	< 0.01	< 0.01
Na, mEq/L	138.53	138.07	138.73	0.361	0.21	0.08

¹D 16 of period.²CTL = Control; PHP = pHix-Up; BIC = Sodium bicarbonate.

Table 10. Chewing and meal behavior, proportion of daily intake during the day, and particle size sorting behavior before¹ the acidosis challenge

	Treatments				P-value	
	CTL ²	PHP	BIC	SEM	CTL vs. PHP	BIC vs. PHP
Meal behavior						
Meal frequency, meals/d	9.6	8.9	9.5	0.48	0.20	0.25
Meal size, kg DM/meal	2.60	2.65	2.55	0.177	0.77	0.60
Meal duration, min/meal	44.7	45.1	43.5	3.09	0.91	0.63
Meal time, min/d	408	384	397	12.0	0.10	0.36
First meal duration, min/meal	75.5	77.8	76.0	5.70	0.91	0.87
Longest meal duration, min/meal	100.3	89.7	87.9	7.11	0.22	0.84
Longest meal size, kg DM/meal	5.48	5.25	4.95	0.353	0.61	0.50
Moment of longest meal, ³ min	265	267	291	71.9	0.98	0.79
Max meal interval, min	263	272	323	19.2	0.71	0.07
Moment of max meal interval, ³ min	1063	1122	1027	77.03	0.59	0.40
Chewing behavior						
Eating, min/d	375	359	371	11.3	0.22	0.36
Rumination, min/d	489	460	472	14.9	0.06	0.44
Chewing, ⁴ min/d	864	818	843	18.7	0.01	0.18
Eating, min/kg DMI	16.2	15.9	16.1	0.71	0.68	0.78
Rumination, min/kg DMI	21.0	20.3	20.5	0.89	0.41	0.79
Chewing, min/kg DMI	37.2	36.2	36.6	1.41	0.41	0.72
Rumination/Rumen pH, min/d	78	73	75	2.4	0.06	0.50
% of daily intake						
07:00-12:30 h	40.8	43.1	44.3	2.04	0.19	0.49
12:30-18:30 h	37.5	37.7	35.9	1.41	0.90	0.37
18:30-07:00 h	21.7	19.2	20.0	1.61	0.10	0.62
Sorting,⁵ Observed/Predicted × 100%						
07:00-12:30 h						
> 19 mm	120	114	115	5.4	0.30	0.89
8-19 mm	91	96	93	2.3	0.14	0.33
< 8 mm	94	93	94	2.8	0.83	0.71
12:30-18:30 h						
> 19 mm	84	90	91	5.2	0.26	0.93
8-19 mm	103	100	101	2.4	0.12	0.57
< 8 mm	107	107	106	2.7	0.99	0.73
18:30-07:00 h						
> 19 mm	90	90	93	5.1	0.98	0.47
8-19 mm	103	101	102	2.0	0.32	0.67
< 8 mm	106	110	107	3.3	0.12	0.38

¹D 16 of period.²CTL = Control; PHP = pHix-Up; BIC = Sodium bicarbonate.³Minutes relative to feeding at 07:00 h.⁴Chewing = eating + rumination.⁵Penn State Particle Separator. > 100 = preferential intake; < 100 = refusal; 100 = no sorting.

Table 11. Chewing and meal behavior, proportion of daily intake during the day, and particle size sorting behavior during¹ the acidosis challenge

	Treatments				<i>P</i> -value			
	CTL ²	PHP	BIC	SEM	Day	Treat × Day	CTL vs. PHP	BIC vs. PHP
Meal behavior								
Meal frequency, meals/d	9.3	9.1	9.5	0.26	< 0.01	0.87	0.59	0.18
Meal size, kg DM/meal	2.53	2.56	2.59	0.106	< 0.01	0.96	0.75	0.73
Meal duration, min/meal	43.2	41.1	41.2	1.88	< 0.01	0.99	0.12	0.91
Meal time, min/d	386	366	381	13.5	< 0.01	0.72	0.07	0.16
First meal duration, min/meal	71.0	67.1	75.5	5.69	< 0.01	0.28	0.39	0.08
Longest meal duration, min/meal	98.1	87.9	92.1	6.55	< 0.01	0.34	0.11	0.51
Longest meal size, kg DM/meal	5.30	5.31	5.38	0.332	< 0.01	0.18	0.97	0.83
Moment of longest meal, ³ min	251	221	172	36.7	< 0.01	0.50	0.56	0.36
Max meal interval, min	313	328	322	15.7	< 0.01	0.67	0.45	0.77
Moment of max meal interval, ³ min	1074	1044	1010	20.1	0.06	0.18	0.28	0.25
Chewing behavior								
Eating, min/d	353	336	349	12.9	< 0.01	0.97	0.10	0.22
Rumination, min/d	454	438	453	12.1	< 0.01	0.98	0.16	0.21
Chewing, ⁴ min/d	807	774	802	19.0	0.02	0.99	0.02	0.06
Eating, min/kg DMI	15.9	14.9	14.7	0.79	< 0.01	0.20	0.17	0.79
Rumination, min/kg DMI	20.4	19.4	19.1	0.74	< 0.01	0.36	0.08	0.64
Chewing, min/kg DMI	36.3	34.3	33.8	1.32	< 0.01	0.10	0.07	0.60
Rumination/Rumen pH, min/d	73	70	73	2.0	< 0.01	0.98	0.15	0.15
% of daily intake								
07:00-12:30 h	41.7	44.3	45.5	1.53	< 0.01	0.32	0.06	0.36
12:30-18:30 h	38.7	40.0	35.9	1.21	< 0.01	0.02	0.26	< 0.01
18:30-07:00 h	19.6	15.7	18.5	1.18	< 0.01	0.73	< 0.01	0.03
Sorting, ⁵ Observed/Predicted × 100%								
07:00-12:30 h								
> 19 mm	105	93	101	4.8	< 0.01	0.49	0.03	0.14
8-19 mm	96	99	97	1.7	0.04	0.04	0.21	0.56

< 8 mm	98	101	100	1.9	< 0.01	0.46	0.17	0.68
12:30-18:30 h								
> 19 mm	93	92	89	3.9	0.07	0.12	0.83	0.46
8-19 mm	98	99	102	1.6	0.59	0.01	0.49	0.18
< 8 mm	106	107	107	1.7	0.05	0.06	0.77	0.82
18:30-07:00 h								
> 19 mm	97	97	93	4.9	< 0.01	0.74	0.98	0.29
8-19 mm	97	97	98	1.8	0.01	0.67	0.84	0.68
< 8 mm	108	114	111	3.9	0.13	0.57	0.22	0.46

¹D 18 to 20 of period.

²CTL = Control; PHP = pHix-Up; BIC = Sodium bicarbonate.

³Minutes relative to feeding at 07:00 h.

⁴Chewing = eating + rumination.

⁵Penn State Particle Separator. > 100 = preferential intake; < 100 = refusal; 100 = no sorting.

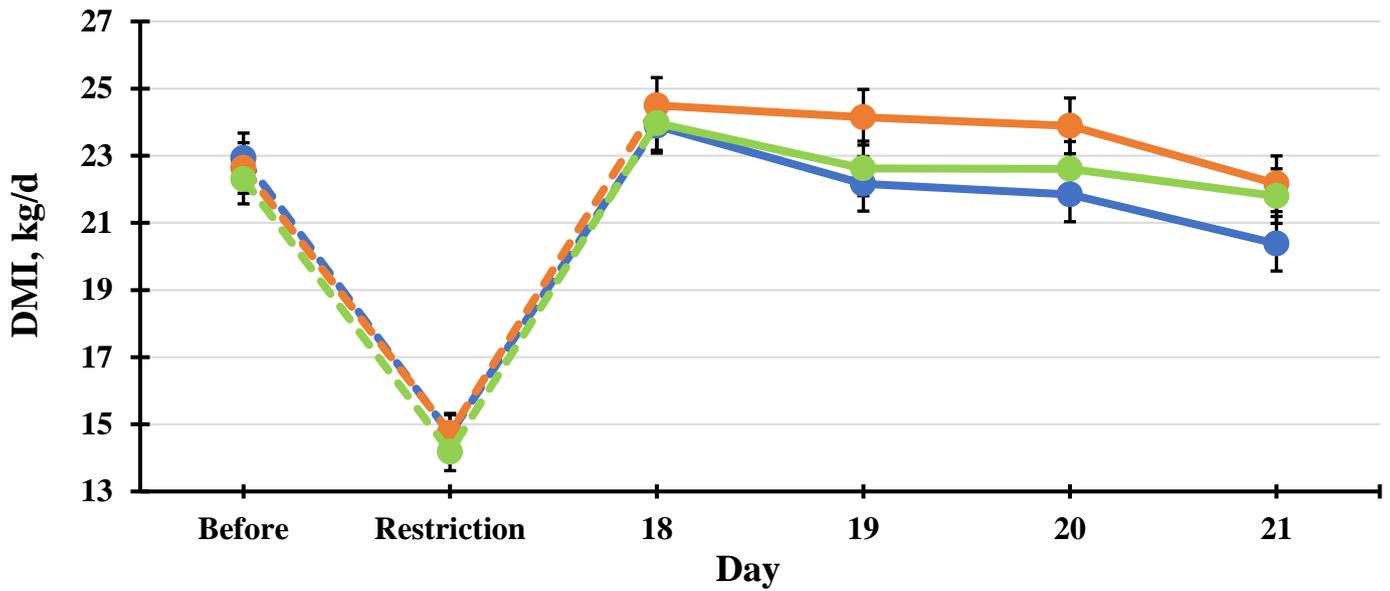


Figure 1. Dry matter intake (DMI) before the acidosis challenge (d 14 to 16), during feed restriction (d 17), and during the acidosis challenge (d 18 to 21) on treatments Control (●), pHix-Up (●), and Sodium bicarbonate (●). For DMI before the acidosis challenge: CTL vs. PHP = 0.21. BIC vs. PHP = 0.51. For DMI during the acidosis challenge: $P < 0.01$ for day; $P = 0.20$ for the interaction between treatment and day. CTL vs. PHP = 0.27. BIC vs. PHP = 0.15.

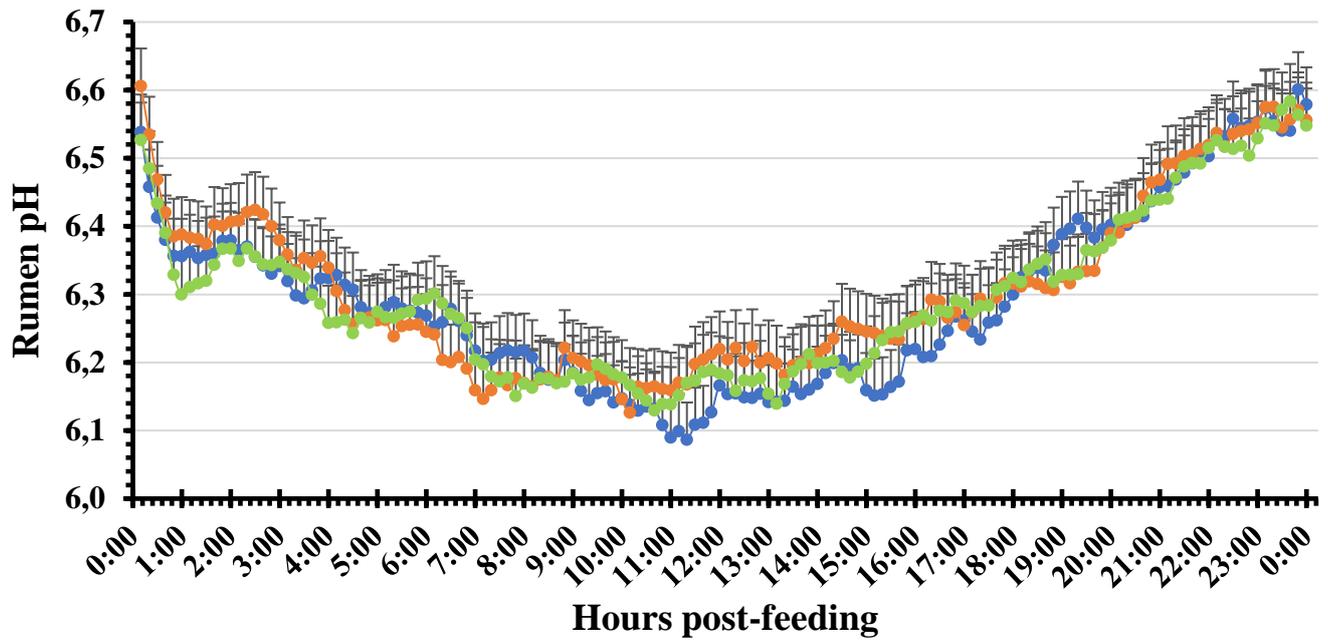


Figure 2. Rumen pH before the acidosis challenge (d 14 to 16) on treatments Control (●), pHix-Up (●), and Sodium bicarbonate (●). CTL = 6.29. PHP = 6.30 and BIC = 6.31. $P < 0.01$ for time and $P = 0.39$ for the interaction between treatment and time. CTL vs. PHP = 0.75. BIC vs. PHP = 0.38. Cows were fed at 07:00 h.

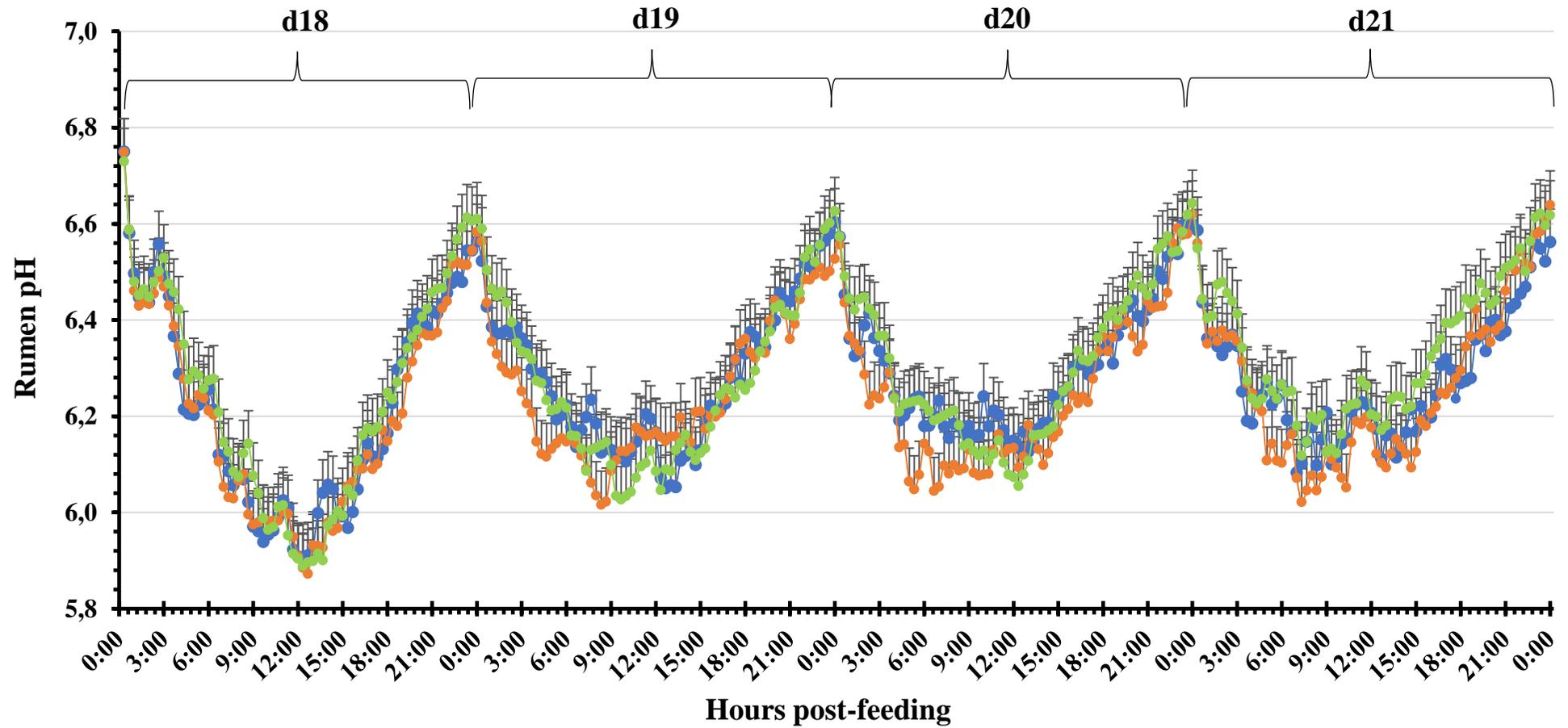


Figure 3. Rumen pH during the acidosis challenge (d 18 to 21) on treatments Control (●), pHix-Up (●), and Sodium bicarbonate (●). CTL = 6.27. PHP = 6.29. BIC = 6.24. $P < 0.01$ for day; $P = 0.53$ for the interaction between treatment and day; $P < 0.01$ for time; $P = 0.71$ for the interaction between treatment and time; $P = 0.97$ for the interaction between treatment, day and time. CTL vs. PHP = 0.14. BIC vs. PHP < 0.01 . Cows were fed at 07:00 h.

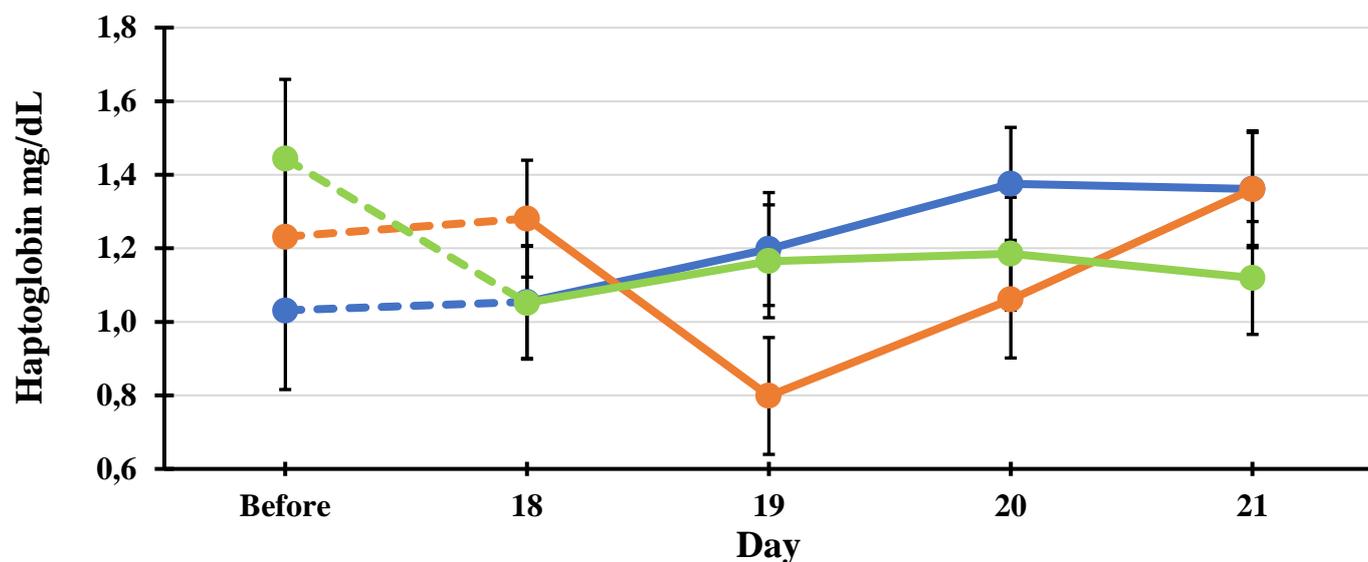


Figure 4. Serum haptoglobin concentration before and during the acidosis challenge on treatments Control (●), pHix-Up (●), and Sodium bicarbonate (●). For serum haptoglobin concentration before the acidosis challenge: CTL vs. PHP = 0.04. BIC vs. PHP = 0.14. For serum haptoglobin concentration during the 4 days of acidosis challenge: $P = 0.79$ for day and $P = 0.02$ for the interaction between treatment and day. CTL vs. PHP = 0.40. BIC vs. PHP = 0.92.

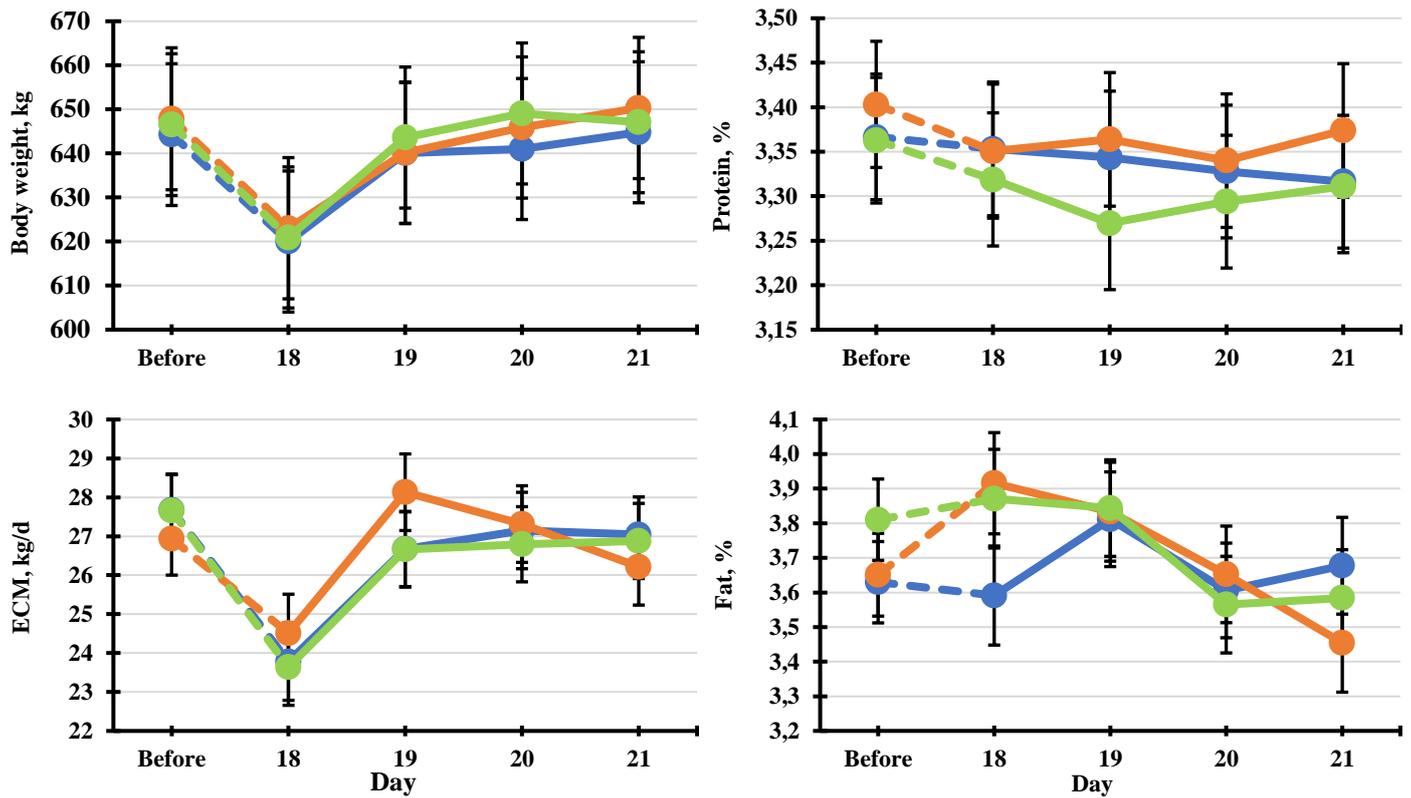


Figure 5. Body weight, ECM, milk protein and fat concentrations before and during the acidosis challenge on treatments Control (●), pHix-Up (●), and Sodium bicarbonate (●). For body weight, ECM, and milk protein before the acidosis challenge: CTL vs. PHP ≥ 0.54 . BIC vs. PHP ≥ 0.19 . For milk fat before the acidosis challenge: CTL vs. PHP = 0.06. BIC vs. PHP = 0.10. For body weight, ECM and milk fat during the acidosis challenge: $P < 0.01$ for day. For milk protein: $P = 0.54$ for day. $P \geq 0.23$ for the interaction between treatment and day for all variables. For body weight, ECM, and milk fat: CTL vs. PHP ≥ 0.21 . BIC vs. PHP ≥ 0.37 . For milk protein: CTL vs. PHP = 0.23. BIC vs. PHP = 0.07.

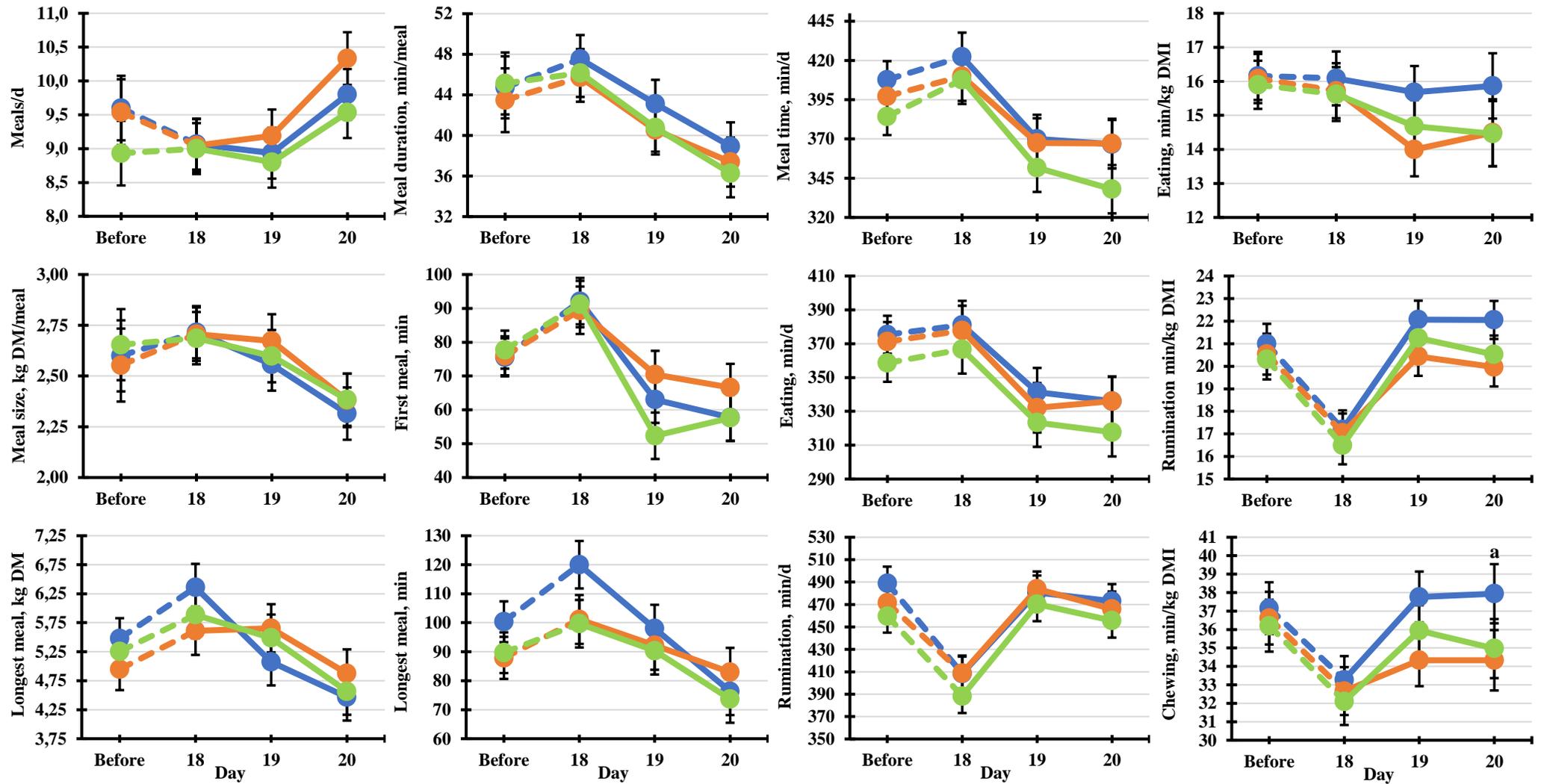


Figure 6. Chewing and meal behavior before (d 16) and during (d 18 to 20) the acidosis challenge on treatments Control (●), pHix-Up (●), and Sodium bicarbonate (●). For all variables, except meal time in min/d, and rumination time in min/d, before the acidosis challenge: CTL vs. PHP ≥ 0.20 . BIC vs. PHP ≥ 0.25 . For meal time in min/d, and rumination time in min/d: CTL vs. PHP ≤ 0.10 . BIC vs. PHP ≥ 0.36 . For all variables during the acidosis challenge: $P < 0.01$ for day. $P \geq 0.18$ for the interaction between treatment and day for all variables, except chewing time, $P = 0.10$. For all variables, except first meal duration, meal and eating time in min/d, and rumination and chewing time in min/kg DMI: CTL vs. PHP ≥ 0.11 . BIC vs. PHP ≥ 0.18 . For first meal duration: CTL vs. PHP = 0.39. BIC vs. PHP = 0.08. For meal and eating time in min/d, and rumination and chewing time in min/kg DMI: CTL vs. PHP ≤ 0.10 . BIC vs. PHP ≥ 0.16 . For chewing in min/kg DMI, ^aCTL vs. PHP = 0.09.

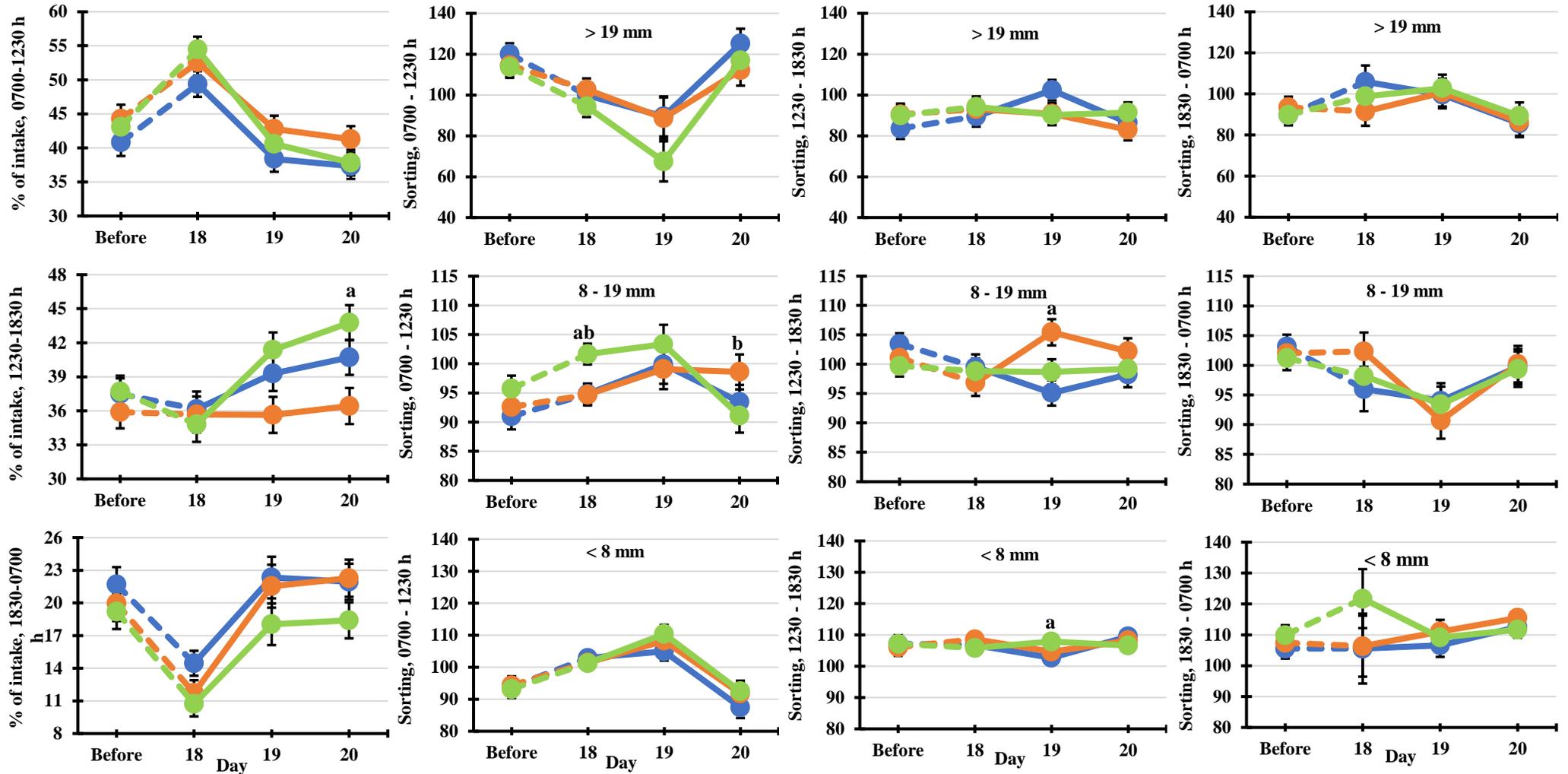


Figure 7. Proportion of daily intake during the day, and particle size sorting behavior before (d 16) and during (d 18 to 20) the acidosis challenge on treatments Control (●), pHix-Up (●), and Sodium bicarbonate (●). For all variables, except % of daily intake 18:30 – 07:00 h, before the acidosis challenge: CTL vs. PHP ≥ 0.12 . BIC vs. PHP ≥ 0.33 . For % of daily intake 18:30 – 07:00 h: CTL vs. PHP = 0.10. BIC vs. PHP = 0.62. For all variables, except sorting 12:30 – 18:30 h > 19 mm ($P = 0.07$), sorting 12:30 – 18:30 h 8 – 19 mm ($P = 0.59$), and sorting 18:30 – 07:00 h < 8 mm ($P = 0.13$), during the acidosis challenge: $P \leq 0.05$ for day. $P \geq 0.12$ for the interaction between treatment and day for all variables, except % of daily intake 12:30 – 18:30 h ($P = 0.02$), sorting 07:00 – 12:30 h 8 – 19 mm ($P = 0.04$), sorting 12:30 – 18:30 h 8 – 19 mm ($P = 0.01$), and sorting 12:30 – 18:30 < 8 mm ($P = 0.06$). For all variables, except % of daily intake 07:00 – 12:30 h (CTL vs. PHP = 0.06. BIC vs. PHP = 0.36.), % of daily intake 12:30 – 18:30 h (CTL vs. PHP = 0.26. BIC vs. PHP ≤ 0.01 .), % of daily intake 18:30 – 07:00 h (CTL vs. PHP ≤ 0.01 . BIC vs. PHP = 0.03.), and sorting 07:00 – 12:30 h > 19 mm (CTL vs. PHP = 0.03. BIC vs. PHP = 0.14.): CTL vs. PHP ≥ 0.17 . BIC vs. PHP ≥ 0.18 . For % of daily intake 12:30 – 18:30 h: ^aBIC vs. PHP ≤ 0.01 . For sorting 07:00 – 12:30 h 8-19 mm: ^aCTL vs. PHP ≤ 0.01 . ^bBIC vs. PHP ≤ 0.03 . For sorting 12:30 – 18:30 h 8-19 mm: ^aBIC vs. PHP = 0.06. For sorting 12:30 – 18:30 h ≤ 8 mm: ^aCTL vs. PHP = 0.10.