



DANIEL EVANGELISTA DORIGO

**EFFECT OF PHYTOGENIC FEED ADDITIVE, YEAST AND
ORGANIC MINERALS ON DAIRY COWS SUBJECTED TO
RUMINAL ACIDOSIS**

**LAVRAS-MG
2026**

Daniel Evangelista Dorigo

**Effect of phytogenic feed additive, yeast and organic minerals on dairy
cows subject to ruminal acidosis**

Dissertação 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 Mestre.

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

LAVRAS-MG
2026

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

Dorigo, Daniel Evangelista.

Effect of phytogenic feed additive, yeast and organic minerals on dairy cows
subject to ruminal acidosis / Daniel Evangelista Dorigo. - 2026.
91 p.

Orientador: Marcos Neves Pereira

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2026.
Bibliografia.

1. Essential oils. 2. Lactating cows. 3. Yeast supplementatios. 4. Ruminal acidosis.
5. Rumen fermentatios. I. Pereira, Marcos Neves. II. Universidade Federal de Lavras.
III. Título.

DANIEL EVANGELISTA DORIGO

**Effect of phytogenic feed additive, yeast and organic minerals on dairy
cows subject to ruminal acidosis**

**Efeitos de aditivo fitogênico associado a levedura e minerais orgânicos em
vacas leiteiras induzidas à acidose ruminal**

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 31 de Março de 2026

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira UFLA

Prof. Dra. Carla Luiza da Silva Ávila UFLA

Prof. Dra. Cristina Simões Cortinhas DSM

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

LAVRAS-MG

2026

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir ter saúde força para seguir em frente em meio a quaisquer dificuldades;

A minha noiva, Beatriz, por todo suporte, apoio, conselhos, paciência ao longo de todo o processo do mestrado.

A minha sogra, Janaína e meu sogro, Diego, por sempre acreditarem em mim;

A minha mãe, Flaviana, meu padrasto, Gustavo, por nunca deixarem faltar nada para mim;

Ao meu tio, Flávio, que sempre foi um forte apoio para me incentivar a estudar;

Aos meus avós, Neuza e Dedé que são fonte de inspiração diária em minha vida;

Aos membros do grupo do leite, por todo suporte ao longo da jornada;

Ao meu professor orientador, Marcos Neves Pereira, por todos os ensinamentos compartilhados;

A todos os professores do DZO e técnicos do LPA;

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – brasil (capes) – código de financiamento 001

RESUMO

Um aditivo fitogênico alimentar (PHY), levedura não viável e minerais orgânicos podem reduzir a acidose ruminal em vacas leiteiras submetidas à alimentação em grande volume único (slug-feeding). Quinze vacas Holandesas ($40,0 \pm 6,9$ kg/d, 103 ± 54 dias em lactação, 607 ± 81 kg) foram alimentadas com uma sequência de tratamentos: controle (CTL), PHY [0,01 % da matéria seca (MS) de Digestarom] e YOM (PHY + 0,075 % da MS de levedura não viável + 0,15 % da MS de fontes orgânicas de S, Cu, Mn, Zn, Se) em quadrados latinos 3×3 com períodos de 35 dias (22 dias de adaptação). As vacas foram ordenhadas 3×/dia e alimentadas individualmente com uma ração total à base de silagem de milho com 31,2 % de amido na MS. Durante os dias 29 e 32 de cada período, a ração foi removida de cada vaca às 19h e as vacas foram alimentadas ad libitum às 7h dos dias 30 e 33 para induzir slug-feeding. Os dados obtidos ao longo do tempo durante os dias 23 a 35 foram analisados como medidas repetidas com o procedimento MIXED do SAS. O modelo incluiu os efeitos de quadrado, vaca (quadrado), período, tratamento, dia e a interação entre tratamento e dia. Dois contrastes foram avaliados: 1) Aditivo fitogênico: CTL vs. PHY+YOM e 2) Levedura + minerais orgânicos: PHY vs. YOM. Significância estatística foi declarada em $P \leq 0,05$ e tendência em $P \leq 0,10$. O protocolo de indução de acidose ruminal induziu variação diária na maioria das variáveis e houve muito poucas interações tratamento $\times$ dia. A restrição alimentar nos dias 29 e 32 induziu picos no consumo de matéria seca (CMS) e na duração da primeira refeição diária, além de reduções na produção de leite, peso corporal e pH ruminal nos dias 30 e 33. Vacas alimentadas com PHY+YOM apresentaram maior CMS do que vacas alimentadas com CTL (23,7 vs. 23,0 kg/d) e houve tendência para YOM aumentar o CMS em relação ao PHY (23,9 vs. 23,5 kg/d). A produção de leite não diferiu (33,0 kg/d), mas o leite corrigido pela energia (ECM) foi maior no PHY+YOM do que no CTL (31,9 vs. 31,0 kg/d). As concentrações no leite de gordura, ácidos graxos pré-formados, mistos e de novo foram todas aumentadas pelo PHY+YOM em relação ao CTL. Vacas alimentadas com PHY+YOM apresentaram maior tempo diário de ruminação do que CTL. A composição do leite de vacas alimentadas com YOM não diferiu do PHY. O pH ruminal medido em intervalos de 30 min, o perfil de fermentação, o rendimento microbiano e o pH fecal não diferiram. O consumo de matéria orgânica digestível (DOMI) foi aumentado no PHY+YOM em relação ao CTL e

tendeu a ser aumentado no YOM em relação ao PHY. A digestibilidade total do trato de MS e MO tendeu a ser maior e o pH sanguíneo jugular foi menor no YOM do que no PHY. Vacas alimentadas com PHY+YOM apresentaram maior pressão parcial de CO₂ no sangue venoso do que CTL. A segunda indução de slug-feeding (d 33) induziu maior pH sanguíneo jugular e excesso de base do que a primeira indução (d 30). A permeabilidade intestinal avaliada pela concentração plasmática de Cr após dose pulso de Cr-EDTA no rúmen e a concentração sérica de proteína ligadora de lipopolissacarídeo não diferiram. Vacas alimentadas com o aditivo fitogênico (PHY+YOM) apresentaram maior CMS, DOMI, ECM, rendimento de gordura e tempo de ruminação do que vacas alimentadas com CTL, sem alteração na fermentação ruminal e permeabilidade intestinal, e a suplementação de levedura + minerais orgânicos (YOM) tendeu a aumentar o CMS e a digestibilidade da dieta em relação ao PHY.

Palavras-chave: óleos essenciais, vacas em lactação, minerais, acidose ruminal, fermentação ruminal, suplementação de levedura

ABSTRACT

A phytogenic feed additive (PHY), non-viable yeast and organic minerals can reduce ruminal acidosis in dairy cows subjected to slug-feeding. Fifteen Holstein cows (40.0 ± 6.9 kg/d, 103 ± 54 days in milk, 607 ± 81 kg) were fed a sequence of treatments, control (CTL), PHY [0.01 % of dry matter (DM) of Digestarom], and YOM (PHY + 0.075 % of DM of non-viable yeast + 0.15 % of DM of organic sources of S, Cu, Mn, Zn, Se) in 3×3 Latin squares with 35-d periods (22-d adaptations). Cows were milked 3 ×/d and individually fed on a corn silage based total mixed ration with 31.2 % starch in DM. During days 29 and 32 of each period, feed was removed from each cow at 1900 h and cows were fed ad libitum at 0700 h of days 30 and 33 to induce slug-feeding. Data obtained over time during days 23 to 35 were analyzed as repeated measures with the MIXED procedure of SAS. The model had the effects of square, cow (square), period, treatment, day, and the interaction between treatment and day. Two contrasts were evaluated: 1) Phytogenic feed additive: CTL vs PHY+YOM and 2) Yeast + organic minerals: PHY vs YOM. Statistical significance was declared at $P \leq 0.05$ and tendency at $P \leq 0.10$. The ruminal acidosis induction protocol induced daily variation in most

variables and there were very few treatment $\times$ day interactions. Feed restriction on days 29 and 32 induced spikes in dry matter intake (DMI) and in the duration of the first daily meal and reductions in milk yield, body weight, and ruminal pH on days 30 and 33. Cows fed PHY+YOM had higher DMI than cows fed CTL (23.7 vs 23.0 kg/d) and there was a tendency for YOM to increase DMI relative to PHY (23.9 vs 23.5 kg/d). Milk yield did not differ (33.0 kg/d), but energy-corrected milk (ECM) was higher on PHY+YOM than CTL (31.9 vs 31.0 kg/d). The concentrations in milk of fat, preformed, mixed and de novo fatty acids were all increased by PHY+YOM relative to CTL. Cows fed PHY+YOM had higher daily rumination time than CTL. Milk composition of cows fed YOM did not differ from PHY. Ruminal pH measured at 30-min intervals, fermentation profile, microbial yield and fecal pH did not differ. The intake of digestible organic matter (DOMI) was increased on PHY+YOM relative to CTL and tended to be increased on YOM relative to PHY. The total-tract digestibility of DM and OM tended to be higher and jugular blood pH was lower on YOM than PHY. Cows fed PHY+YOM had higher partial pressure of CO₂ in venous blood than CTL. The second induction of slug-feeding (d 33) induced higher jugular blood pH and base excess than the first induction (d 30). Gut permeability evaluated by the plasma Cr concentration after pulse dosing Cr-EDTA into the rumen and blood serum lipopolysaccharide binding protein concentration did not differ. Cows fed the phytogenic feed additive (PHY+YOM) had greater DMI, DOMI, ECM, fat yield and rumination time than cows fed CTL without change in ruminal fermentation and gut permeability, and the supplementation of yeast + organic minerals (YOM) tended to increase DMI and diet digestibility relative to PHY.

Key words: essential oils, lactating cows, minerals, ruminal acidosis, rumen fermentation, yeast supplementation

Impactos sociais, tecnológicos, econômicos e culturais

O presente trabalho avaliou o efeito de um aditivo fitogênico, associado ou não a levedura não viável e minerais orgânicos, sobre vacas leiteiras submetidas a indução de acidose ruminal por slug-feeding. Os resultados demonstraram que a suplementação com o aditivo fitogênico aumentou o consumo de matéria seca, a produção de leite corrigido pela energia, o rendimento de gordura do leite e o tempo de ruminação, sem alterar negativamente a fermentação ruminal ou a permeabilidade intestinal. Esses achados indicam ganhos de eficiência produtiva e bem-estar animal em sistemas intensivos de produção de leite, que frequentemente enfrentam desafios relacionados à acidose ruminal subaguda. Do ponto de vista econômico, o aumento no consumo voluntário e na produção de leite corrigido pela energia representa potencial de maior rentabilidade para os produtores, especialmente em rebanhos de alta produção no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, principais polos leiteiros de Minas Gerais. Tecnicamente, o estudo contribui para a validação de estratégias nutricionais alternativas aos ionóforos, alinhadas às restrições de uso de antibióticos e à demanda por produtos mais sustentáveis. Socialmente, a melhoria no desempenho e na saúde das vacas pode reduzir a incidência de distúrbios metabólicos, contribuindo para a longevidade dos animais e para a qualidade de vida dos trabalhadores rurais. Culturalmente, reforça a transição para práticas mais sustentáveis na pecuária leiteira brasileira. O trabalho possui caráter extensionista ao gerar conhecimento aplicável diretamente por produtores, técnicos e consultores da região, podendo beneficiar milhares de vacas em lactação e suas respectivas propriedades. Os impactos se enquadram principalmente nas áreas temáticas de Tecnologia e Produção e Meio Ambiente da Política Nacional de Extensão Universitária.

Social, technological, economic and cultural impacts

This study evaluated the effects of a phytogenic feed additive, alone or combined with non-viable yeast and organic minerals, on dairy cows subjected to ruminal acidosis induced by slug-feeding. The results demonstrated that supplementation with the phytogenic additive increased dry matter intake, energy-corrected milk yield, milk fat yield, and daily rumination time, without negatively affecting ruminal fermentation or intestinal permeability. These findings indicate gains in productive efficiency and animal welfare in intensive dairy systems, which frequently face challenges related to subacute ruminal acidosis (SARA). From an economic perspective, the increase in voluntary feed intake and energy corrected milk production represents potential for greater profitability for dairy producers, particularly in the Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba regions, major dairy hubs in Minas Gerais, Brazil. Technologically, the work contributes to the validation of nutritional strategies as alternatives to ionophores, in line with restrictions on antibiotic use and growing demand for more sustainable dairy products. Socially, improved animal performance and health can reduce the incidence of metabolic disorders, contributing to greater longevity of dairy cows and better working conditions for rural laborers. Culturally, the study reinforces the transition toward more sustainable practices in Brazilian dairy farming. The research has an extensionist character by generating applicable knowledge for producers, technicians, and consultants in the region, with the potential to benefit thousands of lactating cows and their respective farms. The impacts are primarily classified under the thematic areas of Technology and Production and Environment of the Brazilian National Policy for University Extension.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Acidose ruminal em vacas leiteiras	14
2.2 Definição de SARA	16
2.3 Causas e fatores da acidose	17
2.4 SARA, endotoxinas e inflamação.....	19
2.4 Limitações dos marcadores clássicos	20
2.5 Dissociação entre acidose, endotoxinas e inflamação sistêmica	21
2.6 Controle de curto prazo: distensão, osmolaridade e produtos da fermentação	23
2.7 Padrão de refeições e manejo: comportamento como mediador do desempenho	24
2.8 Integração com epitélio ruminal: eficiência de absorção e custo fisiológico	24
2.9 Contextualização e evolução do uso de aditivos fitogênicos	25
2.10 Mecanismos de ação dos fitogênicos no rúmen	26
2.11 Efeitos extra-ruminais e respostas do hospedeiro.....	27
2.12 Variabilidade de resposta aos fitogênicos	29
2.13 O uso de aditivo fitogênico e principais resultados encontrados	30
2.14 Classificação dos produtos de levedura.....	36
2.15 Mecanismos de ação dos produtos de levedura no rúmen.....	38
2.16 Variabilidade de resposta e lacunas da literatura.....	40
2.18 Mecanismos de absorção e biodisponibilidade dos minerais orgânicos.....	41
2.19 Minerais orgânicos sob condições de desafio nutricional	43
2.20 Síntese e lacunas da literatura.....	44
2.21 Por que esperar efeitos combinados entre fitogênicos, produtos de levedura e minerais orgânicos?.....	44
3 REFERÊNCIAS	46

4 ARTIGO	52
INTRODUCTION	54
MATERIALS AND METHODS	57
Experimental design, cows and treatments.....	57
Feed sampling and analysis	58
Lactation performance, intake, body weight, first meal duration and rumination	59
Digestibility, gut permeability, ruminal microbial yield and fecal viscosity and pH.....	60
Ruminal fermentation	62
Blood acid-base balance	62
Statistical analysis	63
RESULTS.....	63
Lactation performance, intake, body weight, first meal duration and rumination	63
Ruminal fermentation	65
Jugular blood acid-base balance	66
Diet Digestibility, Fecal viscosity and pH. and gut permeability	66
DISCUSSION.....	67
Day Effect and Physiological Responses to Repeated Acidotic Challenges	67
Effects of Supplementation	69
CONCLUSION	72
REFERENCES	73
TABLES AND FIGURES.....	80

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de acidose ruminal subaguda (SARA) pode ter impactos negativos sobre o bem-estar animal e a rentabilidade da produção de leite (Golder e Lean, 2024). A SARA pode ser causada por dietas com baixa relação entre fibra fisicamente efetiva e carboidratos de rápida fermentação (Khorrami et al., 2021) ou por práticas de manejo nutricional capazes de induzir acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV) e baixo pH ruminal (Aschenbach et al., 2011; Melo et al., 2013), possivelmente afetando a função de barreira do trato digestivo (Plaizier et al., 2022). A frequência de vacas que expressam um ou múltiplos episódios de slug feeding em rebanhos leiteiros pode aumentar em instalações superlotadas com pouco espaço de cocho por vaca, quando a estratégia de agrupamento não separa primíparas de multíparas, ou quando há entrega inconsistente de ração (Stone, 2004). Esses padrões irregulares de consumo geram grandes oscilações na fermentação ruminal e podem comprometer a integridade da barreira gastrointestinal, favorecendo o aumento da permeabilidade intestinal e a translocação de componentes microbianos (Plaizier et al., 2022). Modelos experimentais de restrição alimentar seguidos de realimentação intensa demonstram claramente o aumento da permeabilidade do trato gastrointestinal e ativação inflamatória sistêmica (Goetz et al., 2024), cenário semelhante ao que ocorre em episódios de slug feeding. Nesses cenários, práticas de manejo que levam as vacas a realizarem refeições menos frequentes, maiores ou irregulares podem estar associadas ao aumento da incidência de SARA (Krause e Oetzel, 2006). A suplementação de vacas leiteiras com aditivos fitogênicos, levedura morta e minerais orgânicos pode auxiliar no controle da SARA e está alinhada com a tendência natural dos consumidores de produtos lácteos, de diminuir o uso de antibióticos, por exemplo.

Aditivos fitogênicos compreendem um grupo diverso de compostos derivados de plantas, incluindo óleos essenciais, oleorresinas e extratos bioativos, que têm sido propostos como alternativas funcionais aos ionóforos em dietas de ruminantes. Os óleos essenciais podem exercer ação ruminal e sistêmica em vacas leiteiras (Silva et al., 2020). Esses aditivos são geralmente comercializados como misturas de compostos, explorando os efeitos específicos e sinérgicos de cada componente da blend (Calsamiglia et al., 2007). A resposta animal a uma mistura específica pode depender da composição, da dosagem e do grau de desafio de

SARA no rebanho (Kröger et al., 2017). Qualquer mistura de aditivos exige validação experimental específica para o produto.

Uma mistura de aditivos fitogênicos composta por especiarias, ervas e óleos essenciais, principalmente de hortelã, tomilho, alecrim e cravo (Digestarom®), tem sido avaliada como ferramenta para controlar a SARA. Essa mistura reduziu a duração do pH ruminal $< 6,0$ e aumentou o tempo de ruminação em vacas Holandesas não lactantes submetidas a um protocolo de indução de acidose ruminal (Kröger et al., 2017). Ela afetou o pH ruminal, o perfil de fermentação, a concentração de LPS e o microbioma durante a acidose ruminal (Kröger et al., 2017; Neubauer et al., 2018; Humer et al., 2018) e melhorou a digestibilidade total da NDF no trato digestivo (Castillo-Lopez et al., 2022). A mesma mistura foi comparada com a monensina como suplemento para vacas Holandesas em meio de lactação alimentadas por 9 semanas com uma dieta contendo 25,2 % de amido (Poletti et al., 2025). Ela reduziu o consumo de matéria seca e aumentou o leite corrigido pela energia (ECM), devido ao aumento na secreção de gordura do leite, e reduziu a concentração sérica de haptoglobina, sem efeito detectável sobre o pH ruminal ou o perfil de fermentação. O modo de ação de uma mistura específica de aditivos pode variar e são necessárias mais evidências de eficácia em vacas leiteiras em lactação.

Aditivos à base de levedura têm sido amplamente avaliados para controlar a SARA e melhorar a digestibilidade da fibra em bovinos de leite (Desnoyer et al., 2009). Metabólitos do conteúdo celular de levedura morta de *S. cerevisiae* podem estimular os consumidores de lactato e os microrganismos degradadores de fibra no rúmen (Callaway e Martin, 1997) e podem aumentar a frequência de refeições, o que se acredita reduzir a carga ácida no rúmen (Bach et al., 2007). Embora células vivas e viáveis de levedura sejam comumente encontradas no rúmen e nas fezes de ruminantes, especialmente naqueles alimentados com silagens (Fernandes et al., 2019; Sales et al., 2023), a suplementação com levedura morta pode melhorar a produção de leite e seus componentes em vacas leiteiras (Dias et al., 2018), especialmente no início da lactação (Poppy et al., 2012). Além disso, minerais orgânicos podem afetar a função ruminal e a biodisponibilidade de minerais (Weiss e Hansen, 2024), especialmente durante períodos de maior demanda metabólica (Lopreiato et al., 2020; McKnight et al., 2025), sugerindo que a associação de levedura morta e minerais orgânicos com aditivos fitogênicos pode melhorar a eficácia da mistura.

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito de uma mistura de aditivos fitogênicos, isoladamente ou acrescida de levedura morta e fontes orgânicas de S, Cu, Mn, Zn e Se, sobre o desempenho produtivo, consumo de matéria seca (CMS), eficiência alimentar, perfil de ácidos graxos do leite, comportamento de mastigação, fermentação ruminal e rendimento microbiano, equilíbrio ácido-base sanguíneo, digestibilidade total da dieta no trato digestivo e permeabilidade intestinal de vacas leiteiras submetidas a um protocolo de indução de acidose ruminal. O objetivo do protocolo foi simular um cenário de restrição alimentar que induzisse slug feeding de uma dieta rica em amido duas vezes em um intervalo de 3 dias. Nossa hipótese foi que a mistura de aditivos fitogênicos reduziria a SARA e melhoraria o CMS, a digestibilidade e o desempenho lactacional, e que a adição de levedura morta e minerais orgânicos melhoraria a eficácia em relação à mistura isolada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Acidose ruminal em vacas leiteiras

A acidose ruminal é reconhecida como um dos principais distúrbios digestivos associados a sistemas intensivos de produção de leite, particularmente em vacas de alta produção alimentadas com dietas ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis (Plaizier et al., 2008; Plaizier et al., 2022). O aumento da densidade energética das dietas, necessário para sustentar elevadas produções de leite, frequentemente resulta em maior oferta de substratos fermentescíveis no rúmen, intensificando a produção de ácidos graxos voláteis e desafiando os mecanismos fisiológicos de tamponamento, passagem e absorção pela parede ruminal (Plaizier et al., 2008).

No contexto da produção leiteira moderna, a forma mais frequentemente discutida é a acidose ruminal subaguda (subacute ruminal acidosis; SARA), caracterizada por depressões repetidas do pH ruminal ao longo do dia, geralmente associadas ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, propionato e butirato, e não ao acúmulo de ácido láctico, como observado na acidose ruminal aguda (Plaizier et al., 2008; Khafipour et al., 2009). O aumento na concentração de AGCC e queda de pH na SARA reflete uma fermentação intensa de carboidratos não fibrosos, aliada a limitações na remoção e neutralização desses ácidos.

A acidose ruminal aguda é definida por quedas severas do pH ruminal, frequentemente abaixo de 5,0, acompanhadas por acúmulo de ácido láctico, redução da motilidade ruminal e comprometimento severo da função digestiva, podendo resultar em distúrbios clínicos graves (Plaizier et al., 2008; Slyter, 1976). Em contraste, a SARA envolve uma redução menos acentuada do pH, porém mais prolongada e recorrente, sendo considerada uma condição funcional e multifatorial, com manifestações variáveis entre animais e sistemas de manejo (Plaizier et al., 2022).

A acidose subaguda deve ser interpretada como uma alteração do padrão fermentativo, marcada por aumento da produção de AGV e mudanças na proporção entre os diferentes produtos da fermentação ruminal (Nagaraja e Titgemeyer, 2007).

Diversos estudos experimentais demonstram que dietas ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis alteram significativamente o perfil dos AGV. Em novilhos submetidos a desafio com dieta altamente concentrada, Goad et al. (1998) observaram aumento do AGV total e mudanças no perfil fermentativo, com redução da proporção de acetato e aumento de propionato ao longo do desafio alimentar. Nesse experimento, as concentrações de lactato permaneceram relativamente baixas, confirmando que o desenvolvimento da acidose subaguda esteve mais associado ao acúmulo de AGV do que à acidose láctica.

Resultados semelhantes foram descritos em vacas leiteiras por Khafipour et al. (2009), que observaram aumento do AGV total e mudanças importantes na partição fermentativa durante desafio com grãos. Nesse estudo, a concentração de acetato diminuiu enquanto o propionato aumentou, reduzindo a relação acetato:propionato de 2,86 para 1,61. De maneira semelhante, Li et al. (2012) observaram que desafios dietéticos capazes de induzir SARA promoveram tendência de aumento do propionato e redução da relação acetato:propionato, além de alterações fermentativas no intestino posterior decorrentes do maior fluxo de amido não digerido para o ceco.

Entretanto, nem todos os modelos experimentais de acidose apresentam o mesmo padrão fermentativo. No estudo de Krause e Oetzel (2005), em que a acidose foi induzida por desafio alimentar com pellets de trigo e cevada, o acetato foi o ácido graxo volátil que apresentou o maior aumento durante o dia de desafio. Nesse caso, embora tenha ocorrido acidificação do rúmen, a relação acetato:propionato permaneceu sempre acima de 2 ao longo

do período experimental. Esse resultado é particularmente interessante porque contrasta com o padrão frequentemente descrito na literatura, em que a acidose está associada à redução dessa relação. No entanto, os autores não compararam diretamente esses valores de AGV com concentrações basais medidas antes do desafio fermentativo, o que impede afirmar que a acidose tenha aumentado a relação acetato:propionato. Assim, o que pode ser concluído a partir desse experimento é que, apesar da acidose induzida, o perfil fermentativo manteve predominância de acetato e não apresentou a queda típica da relação acetato:propionato observada em outros estudos.

De forma geral, os estudos experimentais indicam que a acidose ruminal está associada a intensificação da fermentação e alterações no perfil dos AGV, frequentemente com aumento do propionato e redução da relação acetato:propionato. Entretanto, resultados como os observados por Krause e Oetzel (2005) demonstram que esse padrão não é universal e pode variar conforme o modelo experimental, o tipo de carboidrato fermentado, o nível de adaptação do rúmen e a dinâmica de ingestão alimentar. Dessa forma, a acidose ruminal deve ser interpretada como um distúrbio fermentativo complexo, no qual o perfil de AGV pode responder de maneiras distintas dependendo das condições dietéticas e fisiológicas do animal.

2.2 Definição de SARA

Apesar do amplo uso do termo SARA, não existe consenso absoluto quanto à sua definição (Plaizier et al., 2008; Plaizier et al., 2022). Tradicionalmente, a SARA tem sido definida com base em valores de pH ruminal inferiores a determinados limiares por períodos específicos do dia, com valores frequentemente reportados entre pH 5,6 e 6,2 (Plaizier et al., 2008; Kleen et al., 2003). No entanto, esses limiares são influenciados pelo método de coleta do fluido ruminal, pelo local de amostragem no rúmen e pelo momento da mensuração em relação ao fornecimento da dieta (Duffield et al., 2004).

A variabilidade circadiana no pH ruminal ao longo do dia é elevada, refletindo oscilações nas taxas de ingestão e de fermentação e na salivação. Além disso, o pH pode variar substancialmente entre diferentes compartimentos do rúmen, o que limita a representatividade de medições pontuais (Keunen et al., 2002; Duffield et al., 2004). Dessa forma, o tempo gasto abaixo de valores críticos de pH tem sido considerado um indicador

mais informativo da severidade do desafio acidótico do que o pH médio diário, por refletir melhor a duração da exposição do epitélio ruminal a um ambiente ácido (Plaizier et al., 2008; Plaizier et al., 2022).

2.3 Causas e fatores da acidose

As principais causas da SARA incluem o fornecimento de dieta com teor excessivo de carboidratos rapidamente fermentáveis, como aido, relativamente à disponibilidade de fibra longa fisicamente efetiva (NASEM, 2021) e falhas no manejo alimentar que favorecem ingestão concentrada em curtos períodos (Plaizier et al., 2008; Stone, 2004). A redução da fibra fisicamente efetiva compromete a mastigação e a salivação, diminuindo o aporte de bicarbonato ao rúmen e, consequentemente, a capacidade de tamponamento do ambiente ruminal, e também reduz a motilidade ruminal e consequentemente a remoção de AGCC por absorção e passagem (Mertens, 1997; Resende Júnior et al., 2006)

Essas condições promovem rápida produção de AGCC, aumento da carga ácida ruminal e depressões transitórias, porém recorrentes, do pH ruminal, especialmente no período pós-prandial (Plaizier et al., 2008; Plaizier et al., 2022). Além da composição da dieta, fatores de manejo, como restrição alimentar seguida de realimentação e práticas que induzem slug-feeding, são reconhecidos como importantes indutores de instabilidade ruminal, mesmo na ausência de mudanças extremas na composição química da dieta (Plaizier et al., 2022; Khafipour et al., 2009).

A SARA tem sido associada à redução da ingestão de matéria seca, menor digestibilidade da fibra, depressão do teor de gordura do leite e aumento da variabilidade no desempenho produtivo (Plaizier et al., 2008; Kleen et al., 2003). A depressão da ingestão está relacionada tanto a sinais ruminais quanto a respostas sistêmicas que limitam o consumo voluntário, particularmente em situações de instabilidade fermentativa.

Entretanto, a magnitude dessas respostas é altamente variável e depende da intensidade do desafio, da duração da exposição e da capacidade adaptativa individual das vacas (Plaizier et al., 2022). Estudos indicam que vacas submetidas a desafios semelhantes de pH ruminal podem apresentar respostas produtivas distintas, sugerindo que fatores além da depressão do pH (como adaptação metabólica, integridade epitelial e respostas sistêmicas) desempenham

papel relevante na manifestação dos efeitos da SARA (Plaizier et al., 2022; Aschenbach et al., 2019).

O estresse térmico também é um importante fator ambiental capaz de comprometer o desempenho produtivo e alterar o metabolismo de vacas leiteiras, podendo também aumentar a predisposição à ocorrência de acidose ruminal subaguda (SARA). Em condições de altas temperaturas e elevada umidade relativa do ar, a capacidade do animal de dissipar calor corporal torna-se limitada, resultando em aumento da temperatura corporal e desencadeando respostas fisiológicas e comportamentais destinadas à manutenção da homeotermia (West, 2003). Entre essas respostas destacam-se a redução do consumo de matéria seca, aumento da frequência respiratória, maior fluxo sanguíneo periférico e alterações no comportamento alimentar, como menor atividade e maior busca por áreas sombreadas ou ventiladas (West, 2003).

A redução do consumo de matéria seca é uma das respostas mais consistentes ao estresse térmico e está diretamente associada ao aumento do índice temperatura-umidade (THI). À medida que o THI aumenta, observa-se diminuição significativa da ingestão alimentar e da produção de leite, evidenciando o impacto direto do ambiente térmico sobre o metabolismo e o desempenho das vacas leiteiras (West, 2003). Outro aspecto importante refere-se às alterações fisiológicas provocadas pelo estresse térmico no sistema digestivo. Durante episódios de calor, ocorre redistribuição do fluxo sanguíneo para tecidos periféricos como pele e extremidades, mecanismo que auxilia na dissipação de calor corporal. Entretanto, essa adaptação pode reduzir o fluxo sanguíneo para o trato gastrointestinal e alterar o metabolismo de nutrientes, afetando a digestão e a absorção ruminal (West, 2003). Essas alterações fisiológicas podem comprometer a estabilidade fermentativa do rúmen, principalmente quando associadas a dietas com maior proporção de carboidratos rapidamente fermentáveis.

Além disso, a redução da ingestão de fibra fisicamente efetiva durante períodos de estresse térmico pode diminuir a atividade de mastigação e ruminação. Como consequência, ocorre menor produção de saliva, que representa uma das principais fontes de bicarbonato e fosfatos responsáveis pelo tamponamento do ambiente ruminal. A redução da capacidade de tamponamento favorece a queda do pH ruminal, especialmente em situações nas quais a

produção de ácidos graxos voláteis excede a capacidade de neutralização e absorção do rúmen (O'Grady et al., 2008).

Dessa forma, a maior ocorrência de SARA observada durante períodos de calor ou em sistemas com ambiência inadequada pode ser explicada pela interação entre alterações no comportamento ingestivo, mudanças na composição das dietas e adaptações fisiológicas associadas ao estresse térmico. Esses fatores atuam de forma sinérgica aumentando a carga fermentativa no rúmen e reduzindo os mecanismos naturais de tamponamento, favorecendo reduções prolongadas do pH ruminal e elevando o risco de desenvolvimento de acidose ruminal subaguda em vacas leiteiras.

2.4 SARA, endotoxinas e inflamação

A relação entre SARA, endotoxinas bacterianas e inflamação sistêmica tem sido amplamente investigada. Dietas ricas em grãos e desafios acidóticos podem aumentar a concentração de lipopolissacarídeos (LPS) no conteúdo ruminal, em decorrência da lise bacteriana associada à redução do pH ruminal (Gozho et al., 2005, Khafipour et al., 2009). O aumento de LPS no rúmen pode representar um estímulo imunológico potencial, sobretudo quando associado à redução da integridade da barreira epitelial.

Entretanto, o aumento de LPS no rúmen não resulta necessariamente em translocação sistêmica ou resposta inflamatória mensurável. Em modelos experimentais de SARA induzida por grãos, a resposta inflamatória sistêmica mostrou-se dependente do método de indução, da severidade do desafio e da adaptação prévia dos animais (Khafipour et al., 2009). Em outros modelos, observou-se aumento de LPS no rúmen sem alterações consistentes em marcadores sistêmicos de inflamação, como proteínas de fase aguda (Khafipour et al., 2009; Plaizier et al., 2022).

Estudos de campo demonstraram que endotoxinas livres nas fezes estão associadas a fatores de risco para SARA, como dietas com menor teor de fibra, sem que isso seja necessariamente acompanhado por inflamação sistêmica detectável (Li et al., 2010). Esses achados reforçam a ideia de que a inflamação associada à SARA pode ser local, transitória ou subclínica, e que marcadores sistêmicos tradicionais podem não capturar plenamente alterações inflamatórias de baixa intensidade (Plaizier et al., 2022).

2.4 Limitações dos marcadores clássicos

O uso isolado do pH ruminal ou de marcadores inflamatórios sistêmicos apresenta limitações importantes na caracterização da SARA (Plaizier et al., 2008; Plaizier et al., 2022). Revisões recentes destacam que a SARA afeta múltiplos componentes da saúde do trato gastrointestinal, incluindo microbiota, epitélio ruminal e intestinal, função de barreira e respostas inflamatórias locais, que podem não ser plenamente captadas por indicadores sistêmicos tradicionais (Plaizier et al., 2022). Dessa forma, a SARA deve ser compreendida como um desafio multifatorial, caracterizado por instabilidade fermentativa e fisiológica, cujas consequências dependem não apenas da magnitude da depressão do pH ruminal, mas também da interação entre dieta, manejo alimentar e capacidade adaptativa dos animais (Plaizier et al., 2022; Khafipour et al., 2009).

Além disso, diferentes biomarcadores têm sido investigados como ferramentas complementares para a avaliação. Estudos experimentais demonstram que desafios nutricionais capazes de induzir SARA promovem aumento na liberação de lipopolissacarídeos (LPS) no rúmen, resultante da lise de bactérias gram-negativas em ambientes de baixo pH, podendo favorecer a translocação dessas endotoxinas para a circulação sistêmica (Khafipour et al., 2009). Em vacas leiteiras submetidas a desafios nutricionais com dietas ricas em grãos, observou-se aumento significativo da concentração de LPS no fluido ruminal e no plasma, acompanhado pela elevação de proteínas de fase aguda, como haptoglobina e Amiloide sérica A, evidenciando a ativação de resposta inflamatória sistêmica associada à SARA (Khafipour et al., 2009). Resultados semelhantes foram observados por Gozho et al. (2005), que demonstraram que a indução experimental de SARA por meio do aumento da proporção de concentrado na dieta elevou a concentração de LPS no rúmen e aumentou significativamente as concentrações plasmáticas de haptoglobina e Amiloide sérica A, caracterizando uma resposta inflamatória sistêmica decorrente da acidose ruminal (Gozho et al., 2005).

Assim, além do monitoramento do pH ruminal, biomarcadores relacionados à endotoxemia e à resposta inflamatória, como lipopolissacarídeos circulantes, haptoglobina, Amiloide sérica A e proteínas ligadoras de LPS, têm sido propostos como indicadores complementares na avaliação da SARA (Gozho et al., 2005; Khafipour et al., 2009). A utilização integrada desses indicadores permite uma compreensão mais abrangente da

síndrome, uma vez que possibilita avaliar não apenas as alterações fermentativas no rúmen, mas também as consequências sistêmicas associadas ao distúrbio.

Modelos experimentais de acidose ruminal são amplamente utilizados para investigar mecanismos fisiológicos e respostas nutricionais em vacas leiteiras. No entanto, diferenças no desenho experimental, incluindo método de indução, intensidade e duração do desafio, comprometem a comparabilidade entre estudos e impõem limitações importantes à interpretação dos resultados. Evidências acumuladas indicam que a resposta dos animais a esses modelos é altamente dependente do contexto experimental e da capacidade adaptativa individual, o que dificulta a extrapolação direta dos achados para condições de campo ou para interpretações mecanísticas simplistas (Plaizier et al., 2008; Plaizier et al., 2022). Em muitos modelos experimentais, a indução de SARA resulta em quedas transitórias do pH ruminal, sem estabelecimento de acidose persistente ao longo do dia. Estudos demonstram que a magnitude e a duração dessas quedas são fortemente influenciadas pelo protocolo experimental adotado, e não apenas pela composição da dieta (Gozho et al., 2005; Plaizier et al., 2008). Assim, a ausência de redução consistente do pH médio diário não deve ser interpretada como ausência de desafio ruminal, mas sim como indicativo de um modelo de instabilidade fermentativa moderada, frequentemente mais representativo de condições práticas de manejo.

Essa característica é particularmente relevante em estudos que utilizam desafios alimentares de curta duração ou estratégias que promovem ingestão concentrada em períodos específicos, nos quais a acidificação ruminal ocorre de forma episódica e rapidamente reversível (Plaizier et al., 2022). Nesses contextos, indicadores clássicos de acidose podem falhar em capturar a real magnitude do estresse fermentativo imposto aos animais.

2.5 Dissociação entre acidose, endotoxinas e inflamação sistêmica

A relação entre acidose ruminal, liberação de endotoxinas e inflamação sistêmica é altamente dependente do modelo experimental. Embora aumentos na concentração de lipopolissacarídeos (LPS) no rúmen sejam frequentemente observados em dietas ricas em grãos, diversos estudos demonstram que essa resposta local nem sempre se traduz em endotoxemia ou inflamação sistêmica mensurável (Gozho et al., 2005; Khafipour et al., 2009).

Khafipour et al. (2009) evidenciaram que a inflamação sistêmica associada à alimentação com grãos é fortemente influenciada pelo método de indução do desafio, enquanto Li et al. (2010) demonstraram que endotoxina fecal pode aumentar em condições associadas à SARA sem alterações concomitantes em marcadores inflamatórios sistêmicos. Esses resultados indicam que marcadores sanguíneos clássicos podem subestimar desafios ruminais subclínicos ou transitórios, especialmente quando a integridade da barreira gastrointestinal é parcialmente preservada.

O epitélio ruminal desempenha papel fundamental na absorção seletiva de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e eletrólitos, ao mesmo tempo em que limita a passagem de microrganismos e toxinas presentes no conteúdo ruminal. Essa seletividade é mantida principalmente por complexos de junções intercelulares, como as "tight junctions", formadas por proteínas como claudinas e ocludina, que restringem a permeabilidade epitelial em condições fisiológicas (Aschenbach et al., 2019).

Durante desafios fermentativos associados à acidose ruminal subaguda (SARA), o epitélio ruminal pode sofrer alterações estruturais e funcionais que comprometem temporariamente sua função de barreira. Dietas altamente fermentáveis elevam a produção de AGCC, reduzem o pH ruminal e aumentam a osmolaridade do conteúdo ruminal, criando um ambiente que pode afetar a integridade epitelial. Estudos experimentais demonstram que essas condições podem reduzir a função de barreira do epitélio ruminal e aumentar sua permeabilidade, evidenciado por aumento do fluxo de marcadores paracelulares e alterações no tecido epitelial (Schurmann et al., 2014).

Além das alterações funcionais, mudanças estruturais também foram observadas no epitélio ruminal durante episódios de SARA. Em bovinos submetidos a dietas ricas em grãos, Steele et al. (2011) observaram redução na espessura de camadas epiteliais, perda da integridade das junções celulares e aumento de lesões nas papilas ruminais, indicando comprometimento da integridade epitelial durante períodos de acidose fermentativa.

Alterações na função de barreira não se restringem ao rúmen. Evidências experimentais indicam que desafios dietéticos capazes de induzir SARA também podem comprometer a integridade do epitélio do intestino posterior. Wang et al. (2021) demonstraram que a indução experimental de SARA aumentou a permeabilidade do epitélio do cólon, com alterações

estruturais nas “tight junctions”, aumento da permeabilidade epitelial e maior fluxo de dextrana fluorescente através do epitélio, indicando perda da função de barreira no cólon.

Essas alterações na permeabilidade gastrointestinal podem favorecer a translocação de compostos microbianos imunogênicos, particularmente lipopolissacarídeos (LPS) provenientes da lise de bactérias Gram-negativas no rúmen. Em vacas leiteiras submetidas a um desafio experimental de SARA, Khafipour et al. (2009) observaram aumento significativo da concentração de LPS no fluido ruminal e sua detecção na circulação periférica, sugerindo translocação desses compostos através da mucosa gastrointestinal.

A presença desses componentes bacterianos na circulação pode desencadear respostas inflamatórias sistêmicas moderadas. Gozho et al. (2005) demonstraram que a indução experimental de SARA elevou as concentrações plasmáticas de proteínas de fase aguda, como haptoglobina e proteína amiloide sérica A, evidenciando ativação de resposta inflamatória sistêmica mesmo na ausência de sinais clínicos evidentes.

Resultados semelhantes foram observados por Guo et al. (2017), que relataram aumento da concentração de LPS nas veias portal e hepática em vacas alimentadas com dietas altamente concentradas, acompanhado pela ativação de vias inflamatórias no fígado e aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Além das respostas sistêmicas, evidências indicam que o próprio epitélio ruminal pode participar ativamente da resposta imune local. Kent-Dennis et al. (2019) demonstraram que desafios experimentais de SARA podem modular a expressão de genes associados ao reconhecimento imunológico e à inflamação no epitélio ruminal, indicando que esse tecido não atua apenas como barreira física, mas também como componente ativo na resposta imune da mucosa.

Em conjunto, esses achados indicam que a SARA pode comprometer a função de barreira ao longo do trato gastrointestinal, afetando tanto o epitélio ruminal quanto o intestinal. A perda temporária da integridade epitelial pode facilitar a translocação de compostos microbianos e desencadear respostas inflamatórias de baixa intensidade, caracterizando respostas fisiológicas subclínicas que podem impactar a saúde e o desempenho produtivo dos animais (Plaizier et al., 2022).

2.6 Controle de curto prazo: distensão, osmolaridade e produtos da fermentação

O modelo de regulação de curto prazo proposto para vacas em lactação enfatiza que características físicas e químicas da dieta alteram ingestão via distensão retículo-ruminal, osmolalidade e sinais associados aos produtos da fermentação, com integração de sinais periféricos que refletem oferta e utilização de nutrientes (Allen, 2000; Allen, 2014). Esses sinais limitam o tamanho da refeição e ajustam o intervalo entre refeições, funcionando como um mecanismo regulatório para prevenir sobrecarga digestiva e metabólica (Allen, 2000).

Evidência experimental mostra que desafios de “rumen fill” e alterações associadas a componentes fermentativos conseguem reduzir ingestão e modificar o padrão alimentar mesmo em condições nas quais não se espera um distúrbio clínico, reforçando que grande parte da resposta ingestiva é funcional e ocorre antes de qualquer quadro evidente (Dado and Allen, 1995; Allen, 2000).

2.7 Padrão de refeições e manejo: comportamento como mediador do desempenho

O padrão de refeições é um determinante prático da carga fisiológica diária. Mudanças no momento de fornecimento do alimento alteram distribuição das refeições, atividade de alimentação/ruminação e podem impactar produtividade e composição do leite, indicando que o manejo modula a resposta ingestiva e produtiva via comportamento, e não apenas via formulação da dieta (King et al., 2016).

De forma consistente, alterações em características do grão (método de conservação, tamanho de partícula e disponibilidade de amido) modificam ingestão e comportamento alimentar e se refletem em desempenho, reforçando que respostas podem ser mediadas por mudanças na dinâmica de ingestão e na fermentação sem requerer sinais clínicos (Oba & Allen, 2003).

2.8 Integração com epitélio ruminal: eficiência de absorção e custo fisiológico

A eficiência de absorção de AGCC e eletrólitos e a seletividade da barreira epitelial são componentes centrais para manter a homeostase frente a dietas de alta fermentabilidade, influenciando o custo fisiológico pós-prandial e a tolerância do animal à carga digestiva diária (Aschenbach et al., 2019)

Adaptações funcionais e estruturais do epitélio ruminal têm sido associadas a maior capacidade de lidar com alterações do ambiente luminal e a mudanças na eficiência de

utilização de nutrientes ao longo do tempo (Penner et al., 2011; Steele et al., 2011). Nesse quadro, diferenças de desempenho podem emergir por redução do custo fisiológico da ingestão e melhoria da tolerância pós-prandial, sem necessidade de alterações dramáticas em desfechos clássicos (Allen, 2014; Penner et al., 2011; Steele et al., 2011).

Em síntese, ao avaliar respostas ingestivas e produtivas sob desafios alimentares, é essencial considerar que a intervenção pode atuar predominantemente por modulação do padrão de refeições e do comportamento alimentar, alteração da sinalização pós-prandial e mudanças na eficiência/integração epitelial-metabólica, mesmo quando marcadores ruminais pontuais não se alteram de forma expressiva (Allen, 2000; Allen, 2014; King et al., 2016; Aschenbach et al., 2019; Penner et al., 2011).

2.9 Contextualização e evolução do uso de aditivos fitogênicos

O interesse por aditivos fitogênicos na nutrição de ruminantes intensificou-se nas últimas décadas, impulsionado principalmente pelas restrições ao uso de antibióticos promotores de crescimento e ionóforos, bem como pela crescente demanda por sistemas de produção mais sustentáveis e socialmente aceitos. Embora ionóforos como a monensina tenham sido amplamente utilizados em vacas leiteiras devido à sua capacidade de melhorar a eficiência alimentar e modular a fermentação ruminal, preocupações relacionadas à resistência antimicrobiana e à aceitação pelo consumidor estimularam a busca por alternativas de origem natural (Calsamiglia et al., 2007).

Nesse contexto, compostos derivados de plantas passaram a ser avaliados como potenciais moduladores da fermentação ruminal. Inicialmente, grande parte dos estudos concentrou-se em ensaios *in vitro*, nos quais os fitogênicos demonstraram capacidade de inibir microrganismos específicos e alterar vias fermentativas. Entretanto, a extrapolação desses resultados para condições *in vivo* mostrou-se limitada, uma vez que o ambiente ruminal apresenta elevada complexidade e capacidade adaptativa (Calsamiglia et al., 2007). Assim, a literatura evoluiu para estudos *in vivo* que passaram a avaliar não apenas parâmetros fermentativos clássicos, mas também consumo, comportamento ingestivo, desempenho produtivo e respostas fisiológicas sistêmicas.

Os aditivos fitogênicos, constituem uma classe ampla de produtos derivados de plantas, incluindo ervas, especiarias, extratos vegetais, oleorresinas e óleos essenciais. Esses

compostos são originados do metabolismo secundário das plantas e apresentam funções ecológicas relacionadas à defesa contra patógenos, atração de polinizadores e adaptação ambiental (Calsamiglia et al., 2007).

Dentro dessa classe, os óleos essenciais representam apenas uma subcategoria específica, caracterizada por compostos voláteis extraídos principalmente por destilação a vapor. Quimicamente, os óleos essenciais são formados predominantemente por terpenoides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides, como timol, carvacrol, eugenol, cinamaldeído e capsaicina (Calsamiglia et al., 2007). Esses compostos apresentam diferentes propriedades físico-químicas, o que resulta em mecanismos de ação distintos sobre microrganismos ruminais e sobre o próprio animal.

A distinção entre óleos essenciais isolados e blends fitogênicos comerciais é fundamental para a interpretação dos resultados da literatura. Produtos comerciais frequentemente combinam diferentes fontes vegetais e compostos ativos, com o objetivo de explorar efeitos aditivos ou complementares, aumentar a estabilidade do produto e reduzir variações associadas à origem botânica e ao método de extração. Assim, nem todo fitogênico pode ser classificado como óleo essencial, e diferentes blends fitogênicos não devem ser considerados equivalentes entre si.

2.10 Mecanismos de ação dos fitogênicos no rúmen

Os mecanismos de ação dos aditivos fitogênicos são complexos e multifatoriais, dependendo da composição do produto, da dose fornecida e das características da dieta basal. De modo geral, os efeitos primários descritos na literatura envolvem a interação dos compostos ativos com a membrana celular de microrganismos ruminais, resultando em alterações na permeabilidade, no gradiente iônico e no metabolismo energético bacteriano (Calsamiglia et al., 2007).

Compostos fenólicos, como timol e carvacrol, apresentam elevada afinidade por membranas lipídicas, promovendo a dissipação do gradiente de prótons e aumentando o custo energético para manutenção celular. Esse efeito é mais pronunciado em bactérias gram-positivas, embora alguns compostos também possam afetar bactérias gram-negativas, dependendo do peso molecular e da estrutura química (Calsamiglia et al., 2007). Como consequência, ocorrem alterações na taxa de crescimento de populações microbianas

específicas, o que pode resultar em mudanças no perfil fermentativo, como redução da relação acetato:propionato ou modulação do metabolismo do nitrogênio.

Entretanto, diversos estudos *in vivo* demonstram que alterações clássicas na fermentação ruminal, como pH e proporções molares de ácidos graxos voláteis, nem sempre acompanham respostas produtivas observadas com a suplementação de fitogênicos (Tekippe et al., 2013; Kröger et al., 2017). Esse fato sugere que os mecanismos de ação desses compostos não se limitam à modulação direta da fermentação ruminal.

2.11 Efeitos extra-ruminais e respostas.

Embora os efeitos dos aditivos fitogênicos sejam frequentemente discutidos sob a ótica da modulação da fermentação ruminal, evidências crescentes indicam que parte relevante de suas respostas produtivas pode estar associada a efeitos extra-ruminais, envolvendo o comportamento ingestivo, a eficiência metabólica e respostas fisiológicas sistêmicas do hospedeiro. Essa constatação ajuda a explicar por que, em diversos estudos *in vivo*, melhorias em desempenho e eficiência alimentar são observadas mesmo na ausência de alterações expressivas em parâmetros clássicos da fermentação ruminal, como pH e proporções molares de ácidos graxos voláteis.

Kröger et al. (2017) demonstraram que a suplementação com um aditivo fitogênico comercial foi capaz de alterar o comportamento ingestivo e a dinâmica das refeições, promovendo maior estabilidade no consumo de matéria seca em vacas submetidas a dietas desafiadoras. Essas alterações comportamentais, incluindo modificações no tamanho e na distribuição das refeições ao longo do dia, são particularmente relevantes em sistemas intensivos, nos quais flutuações abruptas no padrão de ingestão estão associadas a maior risco de distúrbios digestivos.

De forma consistente, o estudo conduzido por Silva et al. (2020) avaliou os efeitos de um blend microencapsulado de óleos essenciais contendo capsaicina, carvacrol, cinamaldeído e eugenol em vacas leiteiras em lactação. Os autores observaram redução no consumo de matéria seca concomitante ao aumento da produção de leite, resultando em melhora da eficiência alimentar. Adicionalmente, foram relatadas alterações no comportamento ingestivo, incluindo maior proporção da ingestão concentrada no período da manhã, refeições mais longas e menor frequência de refeições diárias. Esses achados indicam

que os fitogênicos podem influenciar a forma como os animais organizam o consumo ao longo do dia, com potenciais reflexos sobre a eficiência de utilização dos nutrientes.

Importante destacar que, no estudo de Silva et al. (2020), as melhorias em eficiência alimentar e desempenho ocorreram sem mudanças expressivas na população microbiana ruminal ou na produção total de ácidos graxos voláteis, reforçando a hipótese de que os efeitos observados não podem ser atribuídos exclusivamente à modulação direta da fermentação ruminal. Além disso, os autores relataram efeitos sistêmicos associados à termorregulação e à oxigenação sanguínea, sugerindo que os óleos essenciais podem atuar em múltiplos níveis fisiológicos.

Resultados semelhantes foram reportados por Diepersloot et al. (2025), que observaram alterações pontuais no consumo de matéria seca e no comportamento ingestivo de vacas suplementadas com blends específicos de óleos essenciais, associadas a mudanças no pH ruminal máximo e na dinâmica das refeições, ainda que os efeitos não tenham sido consistentes ao longo de todo o período experimental. Esses achados reforçam a noção de que os efeitos dos fitogênicos podem ser transitórios ou dependentes da adaptação dos animais e da microbiota ao longo do tempo.

Além do comportamento ingestivo, há evidências de que os fitogênicos possam influenciar respostas metabólicas e inflamatórias do hospedeiro. Estudos conduzidos sob condições de desafio nutricional indicam que alterações na integridade do trato gastrointestinal e aumento da translocação de endotoxinas podem ocorrer mesmo quando o pH ruminal permanece dentro de faixas consideradas normais (Li et al., 2010; Plaizier et al., 2022). Nesse contexto, os fitogênicos podem contribuir para a manutenção da estabilidade fisiológica, atenuando respostas inflamatórias subclínicas e favorecendo uma utilização mais eficiente da energia metabolizável.

Em conjunto, esses resultados indicam que os efeitos dos aditivos fitogênicos não se limitam à modulação direta da microbiota ruminal, mas envolvem uma interação complexa entre fermentação, comportamento ingestivo e respostas sistêmicas do animal. Essa visão integrada é essencial para a correta interpretação da variabilidade observada na literatura e para a compreensão dos mecanismos pelos quais os fitogênicos podem melhorar a eficiência produtiva, especialmente em condições de desafio nutricional.

A literatura demonstra elevada variabilidade nas respostas à suplementação com óleos essenciais isolados. Tekippe et al. (2013), avaliando um produto à base de eugenol e cinamaldeído, relataram efeitos moderados sobre digestibilidade e metabolismo do nitrogênio, sem impactos consistentes sobre produção de leite ou consumo de matéria seca. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos que utilizaram compostos isolados ou combinações simples, destacando a dependência do contexto experimental.

Em contraste, estudos que avaliaram blends fitogênicos comerciais padronizados relatam respostas mais consistentes em eficiência alimentar e desempenho produtivo, especialmente quando os animais são submetidos a dietas desafiadoras. Kröger et al. (2017) e Neubauer et al. (2018) observaram aumento no consumo de matéria seca e melhorias no desempenho de vacas suplementadas com blends fitogênicos, associadas a maior estabilidade do comportamento ingestivo.

Essas diferenças reforçam a noção de que a composição e a padronização do produto são determinantes para a resposta animal, e que a simples classificação do aditivo como “óleo essencial” ou “fitogênico” é insuficiente para prever seus efeitos.

2.12 Variabilidade de resposta aos fitogênicos

A variabilidade de resposta aos aditivos fitogênicos observada na literatura pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo dose, composição do produto, forma física, dieta basal, fase de lactação e nível de desafio nutricional. Estudos comparativos indicam que doses excessivas de determinados compostos podem reduzir o consumo de matéria seca, enquanto doses moderadas podem melhorar a eficiência alimentar sem efeitos negativos sobre ingestão (Tekippe et al., 2013; Diepersloot et al., 2025).

Além disso, a adaptação microbiana ao longo do tempo pode atenuar ou modificar os efeitos iniciais dos fitogênicos, contribuindo para respostas transitórias ou dependentes do período experimental. Essas características tornam essencial a avaliação dos fitogênicos em modelos experimentais que reflitam condições práticas de produção e desafios nutricionais reais.

Desafios nutricionais, como dietas com alto teor de carboidratos fermentáveis ou manejo alimentar irregular, estão associados a distúrbios que vão além da simples redução

do pH ruminal, incluindo alterações na microbiota, inflamação sistêmica e comprometimento da saúde intestinal (Plaizier et al., 2022). A translocação de lipopolissacarídeos para a circulação sistêmica, descrita por Li et al. (2010), ilustra como esses desafios podem impactar negativamente o desempenho produtivo.

Nesse contexto, os aditivos fitogênicos emergem como ferramentas promissoras para mitigar os efeitos negativos desses desafios, melhorando a eficiência produtiva e a estabilidade fisiológica, mesmo quando alterações clássicas da fermentação ruminal não são evidentes.

Em síntese, os aditivos fitogênicos constituem uma classe heterogênea de compostos com potencial para melhorar a eficiência alimentar e o desempenho produtivo de vacas leiteiras. A literatura indica que óleos essenciais isolados apresentam respostas inconsistentes, enquanto blends fitogênicos comerciais padronizados tendem a gerar resultados mais estáveis, especialmente sob condições de desafio nutricional.

Apesar dos avanços, permanecem lacunas importantes relacionadas aos mecanismos extra-ruinais de ação e à interação entre fitogênicos e desafios alimentares agudos. A escassez de estudos integrando desempenho, comportamento ingestivo e digestibilidade sob condições controladas de desafio justifica a condução de experimentos adicionais, como o proposto na presente dissertação.

2.13 O uso de aditivo fitogênico e principais resultados encontrados

Um dos trabalhos a investigar aditivos fitogênicos em condições de desafio ruminal foi conduzido por Kröger et al. (2017). Nesse estudo, vacas Holandesas não lactantes foram submetidas a um modelo experimental de desafio intermitente com dietas contendo alto teor de concentrado. O delineamento incluiu três tratamentos: dieta controle, suplementação com um aditivo fitogênico (Digestarom®) e suplementação com levedura autolisada (Levabon®). O protocolo experimental iniciou com uma fase de alimentação baseada exclusivamente em forragem, seguida por duas fases de desafio com dietas contendo aproximadamente 65% de concentrado, separadas por um período de recuperação com dieta forrageira. Durante o experimento foram avaliados ingestão de matéria seca, comportamento ingestivo, atividade de ruminação e pH reticular.

A mudança da dieta com alta forragem para dietas com alto teor de concentrado provocou alterações marcantes no comportamento ingestivo dos animais. O tempo médio diário de alimentação reduziu de aproximadamente 340 min/dia na dieta com alta forragem para cerca de 227 min/dia na dieta com alto concentrado. De maneira semelhante, o tempo de ruminação foi reduzido de cerca de 611 min/dia para aproximadamente 209 min/dia durante o primeiro desafio com concentrado. Entretanto, durante o segundo desafio observou-se recuperação parcial da atividade de ruminação, com valores próximos de 321 min/dia, sugerindo algum grau de adaptação ao desafio dietético repetido. Em relação ao ambiente ruminal, vacas do grupo controle permaneceram em média 560 minutos por dia com pH reticular abaixo de 6,0 em determinados dias do desafio. Em contraste, vacas suplementadas com o aditivo fitogênico permaneceram aproximadamente 318 minutos por dia abaixo desse limiar, indicando redução considerável na duração da acidificação ruminal. Além disso, em dias específicos do desafio o pH mínimo foi maior nos animais suplementados, atingindo cerca de 5,58, enquanto no grupo controle o valor mínimo foi próximo de 5,19. Esses resultados indicam que a suplementação fitogênica contribuiu para reduzir a intensidade da acidificação ruminal durante o desafio com alto concentrado.

Na sequência dessa linha de pesquisa, Neubauer et al. (2018) investigaram os efeitos desses mesmos aditivos sobre a microbiota ruminal e o perfil de fermentação. O experimento foi conduzido com vacas Holandesas fistuladas distribuídas em delineamento quadrado latino com três tratamentos: controle, aditivo fitogênico e levedura autolisada. O protocolo experimental foi semelhante ao utilizado no estudo anterior (Kroger et al., 2017). Os resultados demonstraram que a inclusão de concentrado na dieta promoveu alterações importantes na composição da microbiota ruminal. Houve redução na diversidade bacteriana e diminuição da abundância relativa de bactérias associadas à degradação de fibra, como espécies dos gêneros *Ruminococcus* e *Butyrivibrio*. Por outro lado, observou-se aumento na abundância de bactérias associadas à fermentação de carboidratos rapidamente fermentáveis, incluindo gêneros como *Prevotella*, *Megasphaera* e *Lachnospira*. Em relação ao perfil de fermentação, a transição para dietas com alto concentrado reduziu a proporção molar de acetato e a relação acetato:propionato, ao mesmo tempo em que aumentou as proporções de propionato e butirato. O aditivo fitogênico promoveu aumento na proporção molar de butirato, enquanto a levedura autolisada apresentou efeito mais evidente sobre a abundância

de bactérias celulolíticas. Além disso, as concentrações totais de AGV variaram ao longo do período pós-alimentação, com valores mais elevados aproximadamente 8 horas após a alimentação durante as fases de alto concentrado.

Complementando esses resultados, Humer et al. (2018) investigaram os efeitos do desafio de acidose sobre marcadores de disbiose ruminal e metabolismo sistêmico. Nesse estudo foram avaliadas concentrações de lipopolissacarídeos (LPS) e aminas biogênicas no fluido ruminal, além de diversos parâmetros metabólicos no plasma sanguíneo. Os resultados mostraram que o primeiro episódio de acidose provocou aumento significativo na concentração de LPS no rúmen e de várias aminas biogênicas, incluindo histamina, cadaverina e espermina. A suplementação com o aditivo fitogênico reduziu a concentração de LPS ruminal em cerca de 43% em comparação ao grupo controle durante o primeiro episódio de acidose. Também foram observadas reduções expressivas em aminas biogênicas potencialmente tóxicas. A concentração de histamina foi reduzida em aproximadamente 66%, enquanto a concentração de pirrolidina apresentou redução de cerca de 38%. A suplementação com levedura autolisada também reduziu diversas aminas biogênicas, incluindo metilamina, etanolamina e espermidina. Em relação ao metabolismo sistêmico, o desafio resultou em aumento nas atividades plasmáticas de enzimas hepáticas. As concentrações de AST, GGT e GLDH aumentaram aproximadamente 20%, 8% e 80%, respectivamente, enquanto a concentração plasmática de colesterol apresentou redução de cerca de 43% durante o primeiro episódio de acidose. Análises metabolômicas também indicaram alterações em diversas classes de lipídios plasmáticos, incluindo fosfatidilcolinas e esfingomielinas.

Mais recentemente, Castillo-Lopez et al. (2022) avaliaram os efeitos de um aditivo fitogênico sobre a fermentação ruminal e a digestibilidade de nutrientes em vacas em transição para dietas com alto teor de concentrado. Nesse estudo, o aditivo fitogênico foi incluído na dieta em aproximadamente 0,04% da matéria seca, sendo comparado com uma dieta controle sem suplementação. Durante o experimento foram avaliadas concentrações de AGV em diferentes frações do conteúdo ruminal, além da digestibilidade aparente total dos nutrientes.

Os resultados demonstraram que o aumento do teor de concentrado na dieta elevou as concentrações totais de AGV no fluido ruminal ao longo das semanas experimentais. Em

determinados momentos do experimento, as vacas suplementadas apresentaram maiores concentrações totais de AGV, atingindo cerca de 130 mM, enquanto no grupo controle os valores foram próximos de 116 mM. Alterações também foram observadas no perfil de fermentação, incluindo mudanças nas proporções molares de acetato e butirato ao longo do tempo. Além disso, a suplementação fitogênica aumentou de forma consistente a digestibilidade da fibra. A digestibilidade aparente da fibra em detergente neutro (FDN) foi aproximadamente 62,7% no grupo controle e 67,5% no grupo suplementado durante a fase com dieta forrageira. Em dietas com maior proporção de concentrado, esses valores foram cerca de 69,8% e 74,7%, respectivamente, indicando melhora significativa na digestibilidade da fração fibrosa da dieta causada pelo aditivo fitogênico em dietas de alto nível de concentrado.

Resultados mais aplicados em sistemas de produção leiteira foram relatados por Poletti et al. (2025). Nesse estudo foram avaliadas vacas Holandesas em lactação alimentadas com três estratégias nutricionais: monensina, aditivo fitogênico e um “blend” contendo fitogênico, levedura autolisada e minerais orgânicos. A produção diária de leite foi semelhante entre os tratamentos, com valores próximos de 33 kg/dia. Entretanto, diferenças importantes foram observadas em indicadores de produção corrigida para energia. A produção de leite corrigida para gordura (3,5% FCM) foi aproximadamente 33,8 kg/dia no grupo monensina, enquanto nos grupos suplementados com fitogênico ou blend os valores atingiram cerca de 35,3 kg/dia. De forma semelhante, a produção de leite corrigida para energia (ECM) foi maior nos tratamentos suplementados, atingindo aproximadamente 35,6–35,7 kg/dia, enquanto no grupo monensina o valor foi próximo de 34,4 kg/dia. Esse aumento foi principalmente associado ao maior teor de gordura do leite. A concentração de gordura foi aproximadamente 3,55% no tratamento com monensina, enquanto nos tratamentos com fitogênico e blend os valores atingiram cerca de 3,80% e 3,95%, respectivamente. Consequentemente, a produção diária de gordura do leite aumentou de cerca de 1,18 kg/dia para aproximadamente 1,28 kg/dia nos tratamentos suplementados. Em relação à fermentação ruminal, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para pH ruminal ou perfil de AGV nas condições avaliadas. No entanto, algumas alterações metabólicas foram observadas no sangue, incluindo redução da concentração de ureia sanguínea em vacas que receberam o blend contendo fitogênico, levedura e minerais.

A partir dos resultados observados nesses estudos, fica evidente que o aditivo fitogênico (Digestarom®) atua em diferentes níveis da fisiologia ruminal e pode exercer efeitos consistentes sobre o ambiente ruminal e sobre a resposta metabólica dos animais submetidos a dietas com elevada proporção de concentrado. De modo geral, os trabalhos indicam que a suplementação com esse aditivo contribui para reduzir a duração e a severidade de episódios de pH ruminal baixo, especialmente em condições de desafio. Em experimentos com desafios repetidos de alto concentrado, por exemplo, observou-se redução expressiva no tempo em que o pH permaneceu abaixo de 6,0, além de aumento do pH mínimo observado durante os períodos de maior acidificação ruminal. Esses resultados sugerem que compostos fitogênicos podem contribuir para maior estabilidade do ambiente ruminal, possivelmente por meio de alterações no comportamento ingestivo e na atividade de ruminação.

Além dos efeitos sobre a dinâmica do pH, os estudos também demonstram que o aditivo fitogênico pode modular a composição da microbiota ruminal, especialmente durante a transição para dietas com alto teor de concentrado. A suplementação foi associada à redução na abundância relativa de bactérias relacionadas à fermentação intensiva de carboidratos rapidamente fermentáveis e ao aumento de grupos microbianos potencialmente mais associados à estabilidade fermentativa. Essas alterações na microbiota se refletem também no perfil de fermentação ruminal, com mudanças nas proporções molares de ácidos graxos voláteis, incluindo aumento da proporção de butirato em determinadas fases do desafio nutricional. Alterações desse tipo indicam que o aditivo pode influenciar o direcionamento metabólico da fermentação ruminal, o que pode ter implicações tanto para a saúde ruminal quanto para o metabolismo.

Outro aspecto relevante evidenciado nesses trabalhos é a capacidade do aditivo fitogênico de reduzir a formação de compostos associados à disbiose ruminal, como lipopolissacarídeos (LPS) e determinadas aminas biogênicas. Durante episódios experimentais de acidose ruminal, a suplementação com o aditivo esteve associada a reduções substanciais na concentração ruminal de LPS e de aminas potencialmente tóxicas, como histamina. Esses resultados sugerem que a modulação da microbiota promovida pelo aditivo pode contribuir para reduzir processos de lise bacteriana e a liberação de compostos inflamatórios no ambiente ruminal. Como consequência, essa modulação pode também influenciar respostas metabólicas sistêmicas, evidenciadas por alterações em parâmetros

sanguíneos e no perfil metabolômico plasmático observadas em animais submetidos a desafios acidóticos.

Além dos efeitos sobre fermentação e saúde ruminal, evidências mais recentes indicam que o aditivo fitogênico pode também influenciar a digestibilidade de nutrientes, particularmente da fração fibrosa da dieta. Em experimentos que avaliaram a digestibilidade aparente total do trato digestivo, vacas suplementadas com o aditivo apresentaram aumento consistente na digestibilidade da fibra em detergente neutro (FDN), tanto em dietas predominantemente forrageiras quanto em dietas com maior proporção de concentrado. Esse aumento na digestibilidade da fibra sugere que a modulação da microbiota ruminal promovida pelo aditivo pode favorecer a atividade de microrganismos fibrolíticos ou melhorar as condições fermentativas para a degradação da fração fibrosa da dieta.

os efeitos do aditivo fitogênico também se refletem em indicadores produtivos, especialmente na produção de leite corrigida para energia. Em estudos com vacas em lactação, a suplementação com o aditivo fitogênico resultou em aumento na produção de leite corrigida para gordura e energia, efeito associado principalmente ao aumento na concentração e na produção de gordura do leite. Esses resultados indicam que a modulação do ambiente ruminal promovida pelo aditivo pode melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes e favorecer rotas metabólicas relacionadas à síntese de gordura do leite. Em alguns experimentos, o desempenho produtivo observado com o aditivo fitogênico foi semelhante ou superior ao obtido com o uso de ionóforos, como a monensina, sugerindo que compostos fitogênicos podem representar uma alternativa nutricional interessante em sistemas nos quais o uso de antibióticos promotores de desempenho é limitado ou restrito.

De forma geral, o conjunto de evidências disponíveis indica que o Digestarom® atua principalmente como um modulador da fermentação ruminal, influenciando a microbiota, o perfil de fermentação e a estabilidade do ambiente ruminal durante desafios nutricionais. Esses efeitos podem resultar em menor formação de compostos associados à disbiose ruminal, melhor digestibilidade de nutrientes e, em determinadas condições, melhorias no desempenho produtivo de vacas leiteiras. Dessa forma, o uso de aditivos fitogênicos representa uma estratégia promissora para otimizar a eficiência nutricional e a saúde ruminal em sistemas intensivos de produção de leite.

2.14 Classificação dos produtos de levedura

Os produtos de levedura utilizados na nutrição de vacas leiteiras compreendem uma classe heterogênea de ingredientes, obtidos por diferentes processos industriais e com composições químicas distintas. De forma geral, esses produtos podem ser classificados em levedura viva, cultivo de levedura, levedura autolisada e frações da parede celular, sendo fundamental distinguir essas categorias para a correta interpretação de seus mecanismos de ação e respostas produtivas (Desnoyers et al., 2009; Mahasneh et al., 2023).

A utilização do termo “levedura” de forma genérica, sem especificação do tipo de produto, contribui para a variabilidade de respostas observadas na literatura e dificulta a comparação entre estudos. Assim, a separação conceitual entre essas categorias é essencial para evitar extrapolações inadequadas e para compreender por que produtos aparentemente semelhantes podem apresentar efeitos distintos em condições experimentais comparáveis.

A levedura viva consiste em células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae*, cuja eficácia está diretamente relacionada à sobrevivência e à atividade metabólica das células no ambiente ruminal. Os mecanismos clássicos associados à levedura viva incluem o consumo de oxigênio residual no rúmen, criando um ambiente mais favorável ao crescimento de bactérias anaeróbias estritas, especialmente bactérias fibrotróficas responsáveis pela degradação da fibra (Desnoyers et al., 2009).

Além disso, a levedura viva pode estimular populações bacterianas envolvidas na utilização do lactato, contribuindo para a prevenção de acúmulos excessivos desse ácido orgânico em dietas ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis. Como consequência, observa-se maior estabilidade do pH ruminal e melhoria da digestibilidade da fibra, especialmente em dietas com maior proporção de concentrado (Desnoyers et al., 2009).

Meta-análises indicam que a suplementação com levedura viva pode resultar em aumentos modestos, porém consistentes, no consumo de matéria seca e na digestibilidade da matéria orgânica, embora a magnitude dessas respostas seja fortemente dependente da dose, da viabilidade das células e das características da dieta basal (Desnoyers et al., 2009; Bitencourt et al., 2011). Esses fatores explicam a variabilidade de resultados observada em estudos individuais.

O cultivo de levedura é obtido a partir da fermentação controlada de *Saccharomyces cerevisiae* em um meio específico, resultando em um produto que combina biomassa de

levedura com metabólitos fermentativos, como ácidos orgânicos, peptídeos, nucleotídeos, vitaminas do complexo B e outros fatores de crescimento microbiano (Dann et al., 2000).

Diferentemente da levedura viva, os efeitos do cultivo de levedura não dependem da sobrevivência celular no ambiente ruminal, mas da ação desses metabólitos sobre a microbiota ruminal e o hospedeiro. Dann et al. (2000) demonstraram que a suplementação com cultivo de levedura aumentou o consumo de matéria seca e a produção de leite em vacas alimentadas com dietas ricas em concentrado, sugerindo melhoria da eficiência de utilização dos nutrientes.

Estudos subsequentes indicam que os efeitos do cultivo de levedura são particularmente evidentes sob condições de desafio fermentativo. Kröger et al. (2017) observaram que a suplementação com produtos de levedura em dietas desafiadoras promoveu maior estabilidade do consumo e do desempenho produtivo, enquanto Humer et al. (2018) relataram atenuação de respostas negativas associadas à acidose ruminal subclínica. Neubauer et al. (2018) reforçaram esses achados ao demonstrar melhorias na digestibilidade e no desempenho produtivo, mesmo na ausência de alterações expressivas no pH ruminal médio.

Esses resultados indicam que o cultivo de levedura atua principalmente como modulador da resposta do animal ao desafio, promovendo maior estabilidade fermentativa e fisiológica, aspecto diretamente relacionado ao modelo experimental adotado no presente estudo.

A levedura autolisada é obtida a partir da ruptura controlada das células de levedura, liberando componentes intracelulares e frações da parede celular. Esse tipo de produto é caracterizado por elevado teor de nucleotídeos, peptídeos, aminoácidos livres e carboidratos estruturais, sendo utilizado tanto na alimentação animal quanto na indústria de alimentos (Mahasneh et al., 2023).

Os mecanismos de ação da levedura autolisada diferem daqueles da levedura viva e do cultivo de levedura, estando mais associados ao fornecimento direto de compostos bioativos e à modulação da resposta imune e intestinal. Dessa forma, seus efeitos tendem a ser mais pronunciados em contextos de estresse fisiológico ou sanitário, do que em alterações diretas da fermentação ruminal.

As frações da parede celular da levedura, como β -glucanos e mananoligossacarídeos (MOS), representam uma categoria específica de produtos derivados da levedura. Esses compostos apresentam propriedades imunomoduladoras, capacidade de ligação a patógenos e micotoxinas e efeitos positivos sobre a integridade da mucosa intestinal (Mahasneh et al., 2023).

Estudos revisados por Mahasneh et al. (2023) indicam que produtos ricos em parede celular podem reduzir respostas inflamatórias e melhorar a saúde intestinal, o que pode refletir indiretamente em melhorias no desempenho produtivo, especialmente sob condições de estresse nutricional ou ambiental.

2.15 Mecanismos de ação dos produtos de levedura no rúmen

Os mecanismos de ação dos produtos de levedura no rúmen variam conforme o tipo de produto utilizado. No caso da levedura viva, os efeitos estão associados à atividade metabólica direta das células, incluindo consumo de oxigênio residual, estímulo ao crescimento de microrganismos fibrotróficos e modulação do metabolismo do lactato, resultando em maior digestão da fibra e estabilidade do pH ruminal (Desnoyers et al., 2009).

Para o cultivo de levedura, os mecanismos são predominantemente indiretos, envolvendo o fornecimento de metabólitos fermentativos que favorecem a atividade microbiana e a eficiência da fermentação ruminal. Estudos indicam que esses efeitos podem ocorrer mesmo quando o pH ruminal médio não é alterado, sugerindo a atuação de vias complementares relacionadas à dinâmica microbiana e à resposta fisiológica do hospedeiro (Dann et al., 2000; Kröger et al., 2017; Humer et al., 2018).

Diversos estudos demonstram que a suplementação com produtos de levedura pode aumentar o consumo de matéria seca e melhorar a digestibilidade dos nutrientes, refletindo-se em maior produção de leite ou eficiência alimentar. Meta-análises indicam que essas respostas são mais consistentes em dietas ricas em concentrado ou sob condições de instabilidade fermentativa (Desnoyers et al., 2009).

Kröger et al. (2017) e Neubauer et al. (2018) observaram aumento do consumo e melhorias no desempenho produtivo de vacas leiteiras suplementadas com produtos de levedura, particularmente sob condições de desafio ruminal. Humer et al. (2018) relataram

que esses efeitos ocorreram mesmo quando alterações no pH ruminal médio não foram detectadas, reforçando a importância de mecanismos além da fermentação ruminal clássica.

Dietas ricas em amido, manejo alimentar irregular e estratégias experimentais que envolvem restrição alimentar seguida de realimentação estão associados a profundas alterações no ambiente ruminal e na fisiologia do animal, indo além da simples redução do pH ruminal médio. Esses desafios nutricionais promovem flutuações acentuadas na fermentação, alterações na composição da microbiota ruminal e aumento da produção de metabólitos potencialmente deletérios, o que pode comprometer o consumo de matéria seca, a eficiência alimentar e o desempenho produtivo, mesmo na ausência de episódios clínicos de acidose ruminal severa (Li et al., 2010; Plaizier et al., 2022).

Li et al. (2010) demonstraram que dietas altamente fermentáveis podem levar à lise bacteriana no rúmen e no intestino posterior, resultando na liberação de lipopolissacarídeos (LPS) e em sua translocação para a circulação sistêmica. Esse processo ocorre independentemente de reduções extremas do pH ruminal e está associado à ativação de respostas inflamatórias subclínicas, que podem afetar negativamente o metabolismo energético e a eficiência produtiva. Esses achados reforçam a ideia de que a avaliação de desafios nutricionais deve considerar não apenas o pH ruminal, mas também a estabilidade microbiana e a resposta sistêmica do animal.

De forma complementar, a revisão conduzida por Plaizier et al. (2022) destaca que a acidose ruminal subclínica e outros desafios fermentativos estão associados a alterações no comportamento ingestivo, redução da eficiência de utilização dos nutrientes e comprometimento da integridade do epitélio ruminal. Segundo os autores, flutuações no consumo e no padrão de ingestão, comuns em situações de manejo alimentar irregular ou realimentação abrupta, amplificam os efeitos negativos desses desafios, mesmo quando o pH ruminal médio permanece dentro de faixas consideradas fisiológicas.

Nesse contexto, os produtos de levedura emergem como ferramentas nutricionais capazes de atenuar os efeitos adversos de desafios alimentares, promovendo maior estabilidade do ambiente ruminal e melhor resposta produtiva. Kröger et al. (2017), avaliando a suplementação com produtos de levedura em vacas submetidas a dietas desafiadoras, observaram melhorias no consumo de matéria seca e no desempenho produtivo, associadas a maior estabilidade do pH ruminal e do comportamento ingestivo. Importante destacar que

esses efeitos ocorreram mesmo sem alterações consistentes nas proporções molares de ácidos graxos voláteis, sugerindo que os benefícios observados não podem ser atribuídos exclusivamente à modulação direta da fermentação ruminal.

Resultados semelhantes foram reportados por Dias et al., 2018 que demonstraram que a suplementação com cultivo de levedura em dietas ricas em amido contribuiu para maior estabilidade do ambiente ruminal, melhoria da digestibilidade e atenuação de respostas inflamatórias sistêmicas. Nesse estudo, os efeitos positivos foram particularmente evidentes sob condições de maior desafio fermentativo, reforçando a hipótese de que o cultivo de levedura atua como modulador da resposta do animal ao desafio, mais do que como agente de alteração direta da fermentação ruminal clássica.

Em conjunto, esses resultados indicam que os produtos de levedura, especialmente o cultivo de levedura, podem exercer papel relevante na mitigação dos efeitos negativos de desafios nutricionais, promovendo maior estabilidade fisiológica e eficiência produtiva. Essa característica é particularmente relevante em modelos experimentais que simulam instabilidade ingestiva ou desafios fermentativos agudos, como o adotado no presente estudo, nos quais alterações sutis, porém biologicamente relevantes, podem ocorrer mesmo na ausência de mudanças expressivas nos parâmetros ruminais tradicionais.

2.16 Variabilidade de resposta e lacunas da literatura

Apesar do amplo uso de produtos de levedura, a literatura evidencia elevada variabilidade de resposta, atribuída a fatores como tipo de produto, dose, dieta basal, fase de lactação e nível de desafio nutricional. A utilização do termo “levedura” de forma genérica contribui para interpretações equivocadas e dificulta a comparação entre estudos (Desnoyers et al., 2009; Mahasneh et al., 2023).

Além disso, permanecem lacunas importantes relacionadas à compreensão dos mecanismos extra ruminais associados ao cultivo de levedura e à sua interação com desafios alimentares agudos. Estudos que integrem consumo, digestibilidade, comportamento ingestivo e respostas fisiológicas sob condições controladas de desafio são essenciais para avançar o conhecimento nessa área, justificando a condução do presente experimento.

2.17 Importância dos minerais na nutrição de vacas leiteiras

Os minerais desempenham papel essencial no metabolismo, crescimento, reprodução e manutenção da saúde de vacas leiteiras, atuando como componentes estruturais, cofatores enzimáticos e reguladores de processos fisiológicos fundamentais. Em sistemas de produção intensivos, caracterizados por elevadas exigências produtivas e metabólicas, o adequado suprimento mineral torna-se ainda mais crítico, uma vez que deficiências subclínicas podem comprometer o desempenho produtivo, a eficiência alimentar e a resposta imune, mesmo na ausência de sinais clínicos evidentes (Goff, 2018).

Tradicionalmente, a suplementação mineral em dietas de vacas leiteiras baseia-se em fontes inorgânicas, como sulfatos, óxidos e carbonatos. No entanto, a eficiência dessas fontes pode ser limitada por interações químicas no trato gastrointestinal, antagonismos entre minerais e variações na solubilidade e absorção. Esses fatores têm impulsionado o interesse por fontes alternativas, como os minerais orgânicos, que apresentam potencial para maior biodisponibilidade e utilização metabólica (Goff, 2018).

Os minerais orgânicos são definidos como minerais ligados a moléculas orgânicas, como aminoácidos, peptídeos ou complexos proteicos, formando quelatos ou complexos estáveis. Diferentemente das fontes inorgânicas, nas quais o mineral se dissocia rapidamente no trato gastrointestinal, os minerais orgânicos tendem a permanecer ligados ao ligante orgânico durante parte do processo digestivo, o que pode influenciar sua absorção e metabolismo (Goff, 2018).

Entre as principais formas de minerais orgânicos utilizadas na nutrição de vacas leiteiras destacam-se os quelatados, os complexos aminoácidos e as formas orgânicas específicas, como a levedura enriquecida com selênio. Cada uma dessas formas apresenta características químicas distintas, que determinam sua estabilidade, interação com outros componentes da dieta e biodisponibilidade final para o animal.

É importante destacar que o termo “mineral orgânico” engloba uma ampla variedade de produtos comerciais, com diferenças significativas quanto ao tipo de ligante, grau de complexação e concentração mineral, o que contribui para a variabilidade de respostas observadas na literatura.

2.18 Mecanismos de absorção e biodisponibilidade dos minerais orgânicos

A principal justificativa para o uso de minerais orgânicos na nutrição de vacas leiteiras está relacionada à sua maior biodisponibilidade em comparação às fontes inorgânicas. Segundo Goff (2018), minerais orgânicos podem apresentar menor dissociação no rúmen, reduzindo a formação de complexos insolúveis com outros minerais ou componentes da dieta, como enxofre, ferro e fitatos.

Além disso, a absorção de minerais orgânicos pode ocorrer por vias semelhantes às utilizadas para a absorção de aminoácidos ou pequenos peptídeos, o que potencialmente aumenta a eficiência de transporte através do epitélio intestinal. Esse mecanismo é particularmente relevante em condições de desafio nutricional ou metabólico, nas quais a absorção mineral pode ser comprometida.

Esses aspectos ajudam a explicar por que, mesmo quando fornecidos em níveis semelhantes aos minerais inorgânicos, os minerais orgânicos frequentemente resultam em maiores concentrações teciduais ou melhor status mineral, refletindo maior utilização metabólica.

Diversos estudos têm avaliado os efeitos da substituição parcial ou total de minerais inorgânicos por fontes orgânicas sobre o desempenho produtivo de vacas leiteiras. A meta-análise conduzida por Rabiee et al. (2010) demonstrou que a suplementação com minerais orgânicos esteve associada a aumentos modestos, porém consistentes, na produção de leite e em parâmetros reprodutivos, quando comparada à suplementação exclusiva com minerais inorgânicos.

Esses resultados indicam que a maior biodisponibilidade dos minerais orgânicos pode se traduzir em melhorias funcionais no metabolismo animal, especialmente em sistemas de produção nos quais as exigências minerais são elevadas. Importante ressaltar que os efeitos observados na meta-análise foram influenciados por fatores como o tipo de mineral avaliado, a forma orgânica utilizada e o nível de substituição das fontes inorgânicas.

Além dos efeitos sobre desempenho produtivo, os minerais orgânicos têm sido associados a melhorias no metabolismo e na saúde de vacas leiteiras. Estudos recentes indicam que a suplementação com minerais orgânicos pode influenciar parâmetros relacionados ao status antioxidante, à função hepática e à resposta imune, particularmente em períodos de maior desafio fisiológico, como o início da lactação (Mion et al., 2023).

Mion et al. (2023) observaram que a substituição de minerais inorgânicos por fontes orgânicas resultou em alterações positivas em biomarcadores metabólicos e no status de minerais específicos, sugerindo melhor utilização e menor risco de desequilíbrios metabólicos. Esses efeitos são particularmente relevantes em vacas de alta produção, nas quais o metabolismo mineral está intimamente ligado à eficiência produtiva e à saúde geral.

Embora muitos estudos avaliem os minerais orgânicos de forma isolada, evidências crescentes indicam que seus efeitos devem ser interpretados no contexto do sistema nutricional como um todo. Trabalhos que avaliaram combinações de minerais orgânicos com outros aditivos funcionais, como levedura e fitogênicos, demonstram que esses ingredientes podem atuar de forma complementar, modulando o ambiente ruminal, o metabolismo e a resposta produtiva (Grigoletto et al., 2021).

Grigoletto et al. (2021) avaliaram a suplementação de um blend contendo levedura e minerais orgânicos e observaram respostas positivas no desempenho produtivo e na eficiência alimentar de vacas leiteiras. Esses resultados sugerem que os minerais orgânicos podem potencializar os efeitos de outros aditivos, especialmente em condições de desafio nutricional ou metabólico.

Da mesma forma, estudos que investigaram aditivos fitogênicos em associação com outros componentes da dieta indicam que a modulação do ambiente ruminal e da resposta fisiológica do hospedeiro pode ser influenciada por múltiplos fatores nutricionais atuando de forma integrada (Kröger et al., 2017; Neubauer et al., 2018).

2.19 Minerais orgânicos sob condições de desafio nutricional

Condições de desafio nutricional, como dietas ricas em amido, elevada densidade energética e instabilidade ingestiva, estão associadas a alterações no metabolismo mineral e aumento da demanda por micronutrientes. Nessas situações, a maior biodisponibilidade dos minerais orgânicos pode contribuir para a manutenção do status mineral e da eficiência metabólica, mesmo quando o consumo de matéria seca é afetado.

Estudos que avaliaram minerais orgânicos em modelos de desafio indicam que esses ingredientes podem auxiliar na manutenção da saúde metabólica e da resposta produtiva, especialmente quando utilizados como parte de estratégias nutricionais integradas, combinando diferentes aditivos funcionais (Mion et al., 2023; Grigoletto et al., 2021).

2.20 Síntese e lacunas da literatura

Em síntese, os minerais orgânicos representam uma alternativa nutricional relevante às fontes inorgânicas tradicionais, apresentando potencial para maior biodisponibilidade, melhor utilização metabólica e efeitos positivos sobre desempenho produtivo e saúde de vacas leiteiras. A literatura indica que esses efeitos são mais evidentes em sistemas de produção intensivos e sob condições de desafio nutricional.

Entretanto, permanecem lacunas relacionadas à compreensão dos mecanismos de interação entre minerais orgânicos e outros aditivos funcionais, como fitogênicos e produtos de levedura. Estudos que avaliem essas combinações em modelos experimentais que simulem instabilidade ingestiva e desafio fermentativo são fundamentais para avançar o conhecimento nessa área, justificando a abordagem integrada adotada no presente estudo.

2.21 Por que esperar efeitos combinados entre fitogênicos, produtos de levedura e minerais orgânicos?

A utilização de aditivos funcionais na nutrição de vacas leiteiras tem evoluído de abordagens focadas em ingredientes isolados para estratégias que consideram a interação entre diferentes componentes da dieta. Essa mudança reflete o reconhecimento de que a resposta do animal a desafios nutricionais e metabólicos é multifatorial, envolvendo simultaneamente a microbiota ruminal, o metabolismo do hospedeiro e a disponibilidade de micronutrientes essenciais.

Os aditivos fitogênicos, os produtos de levedura e os minerais orgânicos atuam em níveis fisiológicos distintos, o que sustenta, do ponto de vista conceitual, a expectativa de efeitos complementares quando utilizados em conjunto. Fitogênicos têm sido associados à modulação da fermentação ruminal, à eficiência metabólica e a efeitos extra-ruminais relacionados ao comportamento ingestivo e à eficiência alimentar (Calsamiglia et al., 2007; Kröger et al., 2017). Produtos de levedura, especialmente cultivos de levedura, apresentam efeitos consistentes na estabilidade do ambiente ruminal e na resposta do animal a desafios fermentativos, atuando como moduladores da adaptação fisiológica mais do que como agentes de alteração direta da fermentação clássica (Dann et al., 2000; Humer et al., 2018). Minerais orgânicos, por sua vez, estão associados a maior biodisponibilidade mineral,

suporte metabólico e imunológico, especialmente sob condições de maior exigência fisiológica (Goff, 2018; Rabiee et al., 2010).

Dessa forma, a expectativa de efeitos combinados não se baseia necessariamente em sinergias diretas no rúmen, mas na atuação integrada desses aditivos sobre diferentes gargalos fisiológicos que emergem sob condições de desafio nutricional. Estudos que avaliaram blends contendo mais de um aditivo funcional, como a combinação de levedura e minerais orgânicos, demonstraram respostas positivas no desempenho produtivo e na eficiência alimentar, reforçando a plausibilidade dessa abordagem integrada (Grigoletto et al., 2021).

Importante destacar que a ausência de efeitos sinérgicos clássicos, no sentido estrito do termo, não invalida o uso combinado desses aditivos. Em muitos casos, os benefícios observados podem refletir efeitos aditivos ou complementares, nos quais cada componente contribui para a estabilidade fisiológica do animal por vias distintas.

Apesar do crescente interesse por estratégias nutricionais integradas, a literatura disponível apresenta limitações importantes quanto à avaliação conjunta de fitogênicos, produtos de levedura e minerais orgânicos. A maioria dos estudos publicados avalia esses aditivos de forma isolada ou em combinações parciais, dificultando a extrapolação dos resultados para sistemas que utilizam múltiplos aditivos simultaneamente.

Alguns trabalhos avaliaram blends contendo fitogênicos associados a outros aditivos, demonstrando melhorias na eficiência produtiva e no desempenho sob condições de desafio nutricional (Kröger et al., 2017; Neubauer et al., 2018). Outros estudos investigaram combinações de levedura e minerais orgânicos, evidenciando efeitos positivos sobre consumo, desempenho e indicadores metabólicos (Grigoletto et al., 2021; Mion et al., 2022). No entanto, estudos que avaliem de forma integrada a combinação de fitogênicos, produtos de levedura e minerais orgânicos em um mesmo modelo experimental ainda são escassos.

Além disso, muitos desses estudos foram conduzidos em condições relativamente estáveis de manejo e alimentação, o que pode limitar a expressão dos potenciais benefícios desses aditivos. Como discutido em revisões recentes, os efeitos de aditivos funcionais tendem a ser mais evidentes sob condições de maior desafio, quando a homeostase fisiológica do animal é comprometida (Plaizier et al., 2022).

Diante das evidências disponíveis e das lacunas identificadas, torna-se evidente a necessidade de estudos que avaliem estratégias nutricionais integradas sob condições que

representem desafios reais de manejo. O presente experimento foi delineado para preencher parte dessa lacuna, ao investigar os efeitos da suplementação combinada de fitogênico, cultivo de levedura e mineral orgânico em vacas leiteiras submetidas a um modelo de desafio alimentar.

A escolha desses aditivos baseia-se em evidências prévias de que cada um atua por mecanismos distintos e potencialmente complementares, envolvendo modulação do ambiente ruminal, estabilidade ingestiva e suporte metabólico e mineral. Ao avaliar esses componentes em conjunto, o presente estudo busca avançar além da literatura existente, fornecendo informações relevantes sobre a resposta de vacas leiteiras a estratégias nutricionais integradas em condições de instabilidade ingestiva e desafio fisiológico.

Assim, os resultados deste trabalho contribuem para a compreensão dos efeitos combinados de aditivos funcionais e fornecem subsídios para o desenvolvimento de estratégias nutricionais mais eficientes e resilientes, alinhadas às demandas de sistemas de produção modernos.

3 REFERÊNCIAS

Allen, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83:1598–1624. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75030-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75030-2)

Allen, M. S. 2014. Drives and limits to feed intake in ruminants. *Anim. Prod. Sci.* 54:1513–1524. <http://dx.doi.org/10.1071/AN14478>

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., C. Iglesias, and M. Devant. 2007. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136:146–153. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.09.011>

Bitencourt, L. L., J. R. M. Silva, B. M. L. Oliveira, G. S. Dias Jr., F. Lopes, S. Siécola Jr., O. F. Zacaroni, and M. N. Pereira. 2011. Diet digestibility and performance of dairy cows

supplemented with live yeast. *Sci. Agric.* 68:301–307. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000300005>

Callaway, E. S., and S. A. Martin. 1997. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80:2035–2044. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76148-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76148-4)

Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret. 2007. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90:2580–2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>

Castillo-Lopez, E., R. Rivera-Chacon, S. Ricci, N. Reisinger, and Q. Zebeli. 2022. Changes in fermentation profile of the reticulorumen and hindgut, and nutrient digestion in dry cows fed concentrate-rich diets supplemented with a phytogenic feed additive. *J. Dairy Sci.* 105. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21786>

Dado, R. G., and M. S. Allen. 1995. Intake limitations, feeding behavior, and ruminal fermentation of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert bulk. *J. Dairy Sci.* 78:118–133. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76622-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76622-X)

Dann, H. M., J. K. Drackley, G. C. McCoy, M. F. Hutjens, and J. E. Garrett. 2000. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:123–130. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74863-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74863-6)

Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, G. Bertin, C. Duvaux-Ponter, and D. Sauvant. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 92:1620–1632. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1414>

Diepersloot, E. C., M. R. Pupo, C. Heinzen Jr., M. S. Souza, and L. F. Ferraretto. 2025. Effects of monensin and essential oil blend supplementation on lactation performance and feeding behavior in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 108:2517–2526. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25834>

Duffield, T., J. C. Plaizier, A. Fairfield, R. Bagg, G. Vessie, P. Dick, J. Wilson, J. Aramini, and B. McBride. 2004. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in

lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:59–66. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73142-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73142-2)

Goad, D. W., C. L. Goad, and T. G. Nagaraja. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76:234–241. <https://doi.org/10.2527/1998.761234x>

Golder, H. M., and I. J. Lean. 2024. Invited review: Ruminal acidosis and its definition A critical review. *J. Dairy Sci.* 107:10066–10098. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-24817>

Goff, J. P. 2018. Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 101:2763–2781. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13112>

Gozho, G. N., J. C. Plaizier, D. O. Krause, A. D. Kennedy, and K. M. Wittenberg. 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide release and triggers an inflammatory response. *J. Dairy Sci.* 88:1399–1403. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72807-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72807-1)

Grigoletto, N. T. S., L. G. Ghizzi, L. S. Gheller, M. S. da S. Dias, A. T. Nunes, T. B. P. Silva, G. G. da Silva, L. F. Costa e Silva, D. N. Lobato, and F. P. Rennó. 2021. Effects of a blend of live yeast and organic minerals or monensin on performance of dairy cows during the hot season. *J. Dairy Sci.* 104:11634–11645. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20194>.

Guo, J., G. Chang, K. Zhang, L. Xu, D. Jin, M. S. Bilal, and X. Shen. 2017. Rumen-derived lipopolysaccharide provoked inflammatory injury in the liver of dairy cows fed a high-concentrate diet. *Oncotarget* 8:46769–46780. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18151>

Humer, E., I. Kröger, V. Neubauer, K. Schedle, N. Reisinger, and Q. Zebeli. 2018. Supplementing phytogenic compounds or autolyzed yeast modulates ruminal biogenic amines and plasma metabolome in dry cows experiencing subacute ruminal acidosis. *J. Dairy Sci.* 101:9559–9574. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14744>

Kent-Dennis, C., A. Pasternak, J. C. Plaizier, and G. B. Penner. 2019. Potential for a localized immune response by the ruminal epithelium in nonpregnant heifers following a short-term subacute ruminal acidosis challenge. *J. Dairy Sci.* 102:7556–7569. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16294>

Keunen, J. E., J. C. Plaizier, I. Kyriazakis, T. F. Duffield, T. M. Widowski, M. I. Lindinger, and B. W. McBride. 2002. Effects of a subacute ruminal acidosis model on the diet selection of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:3304–3313. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74419-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74419-6)

Khafipour, E., D. O. Krause, and J. C. Plaizier. 2009. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *J. Dairy Sci.* 92:1060–1070. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1389>

King, M. T. M., R. E. Crossley, and T. J. DeVries. 2016. Impact of timing of feed delivery on the behavior and productivity of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:1471–1482. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9790>

Kleen, J. L., G. A. Hooijer, J. Rehage, and J. P. 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>

Khorrami, B., R. Khiaosa-ard, and Q. Zebeli. 2021. Models to predict the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cows based on dietary and cow factors: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 104:7761–7780. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19890>

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.S0022-0302\(05\)73048-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73048-4)

Kröger, I., E. Humer, V. Neubauer, N. Reisinger, S. Aditya, and Q. Zebeli. 2017. Modulation of chewing behavior and reticular pH in non-lactating cows challenged with concentrate-rich diets supplemented with phytogenic compounds and autolyzed yeast. *J. Dairy Sci.* 100:9702–9714. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12755>

Li, S., E. Khafipour, D. O. Krause, J. C. Rodriguez-Lecompte, and J. C. Plaizier. 2010. Free endotoxins in the feces of lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 90:591–594. <https://doi.org/10.4141/CJAS10017>

Li, S., E. Khafipour, D. O. Krause, A. Kroeker, J. C. Rodriguez-Lecompte, G. N. Gozho, and J. C. Plaizier. 2012. Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:294–303. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4447>

Lopreiato, V., M. Mezzetti, L. Cattaneo, G. Ferronato, A. Minuti, and E. Trevisi. 2020. Role of nutraceuticals during the transition period of dairy cows: A review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 11:96. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00501>

McKnight, M. G., K. M. Harvey, W. I. Jumper, J. Ranches, and B. B. Karisch. 2025. Trace mineral supplementation via organic or inorganic sources for beef cattle during preconditioning and feedlot receiving: A systematic review and meta-analysis. *Transl. Anim. Sci.* 9:txaf119. <https://doi.org/10.1093/tas/txaf119>

Mahasneh, O. K., A. M. Abdelqader, and A. A. Al-Fataftah. 2023. Effect of yeast cell wall on gut health, immunity and milk production of dairy cattle in normal and heat stress conditions. *Jordan J. Agric. Sci.* 19:281–299 <https://doi.org/10.35516/jjas.v19i3.149>

Melo, L. Q., S. F. Costa, F. Lopes, M. C. Guerreiro, L. E. Armentano, and M. N. Pereira. 2013. Rumen morphometrics and the effect of digesta pH and volume on volatile fatty acid absorption. *J. Anim. Sci.* 91:1775–1783. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4999>

Mertens, D. R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:1463–1481. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76075-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76075-2)

Mion, B., B. Van Winters, K. King, J. F. W. Spricigo, L. Ogilvie, L. Guan, T. J. DeVries, B. W. McBride, S. J. LeBlanc, M. A. Steele, and E. S. Ribeiro. 2023. Effects of replacing inorganic salts of trace minerals with organic trace minerals in pre- and postpartum diets on feeding behavior, rumen fermentation, and performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 105:6693–6709. <https://doi.org/10.1093/jas/skad041>

Nagaraja, T. G., and E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-478>

Neubauer, V., R. Petri, E. Humer, I. Kröger, E. Mann, N. Reisinger, M. Wagner, and Q. Zebeli. 2018. High-grain diets supplemented with phytogenic compounds or autolyzed yeast modulate ruminal bacterial community and fermentation in dry cows. *J. Dairy Sci.* 101:2335–2349. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13565>

Oba, M., and M. S. Allen. 2003. Effects of corn grain conservation method on feeding behavior and productivity of lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. *J. Dairy Sci.* 86:174–183. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73598-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73598-X)

O’Grady, L., M. L. Doherty, and F. J. Mulligan. 2008. Subacute ruminal acidosis (SARA) in grazing Irish dairy cows. *Vet. J.* 176:44–49. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.017>

Penner, G. B., M. A. Steele, J. R. Aschenbach, and B. W. McBride. 2011. Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. *J. Anim. Sci.* 89:1102–1119. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3378>

Plaizier, J. C., F. J. Mulligan, E. W. Neville, L. L. Guan, M. A. Steele, and G. B. Penner. 2022. Effect of subacute ruminal acidosis on gut health of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 105:7141–7160. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21960>

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. *J. Dairy Sci.* 91:120–138. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.016>

Poletti, G., N. T. S. Grigoletto, C. S. Takiya, A. T. Nunes, V. V. de Carvalho, C. S. Cortinhas, T. D. Turner, and F. P. Rennó. 2025. Effects of monensin, phytogenic compounds, or a blend of feed additives on health and performance of dairy cows. *Transl. Anim. Sci.* 9:txaf140. <https://doi.org/10.1093/tas/txaf140>

Rabiee, A. R., I. J. Lean, M. A. Stevenson, and M. T. Socha. 2010. Effects of feeding organic trace minerals on milk production and reproductive performance in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 93:4239–4251. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3058>

Resende Junior, J. C., M. N. Pereira, H. Boer, 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)

Sales, G. F. C., B. F. Carvalho, R. F. Schwan, M. A. Silva, A. C. Dias, and C. L. S. Ávila. 2023. Diversity and probiotic characterisation of yeast isolates in the bovine gastrointestinal tract. *Antonie Van Leeuwenhoek* 116:1123–1137. <https://doi.org/10.1007/s10482-023-01865-6>

Schurmann, B. L., M. E. Walpole, P. Górka, J. C. H. Ching, M. E. Loewen, and G. B. Penner. 2014. Short-term adaptation of the ruminal epithelium involves abrupt changes in sodium and short-chain fatty acid transport. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307:R802–R816. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00035.2014>

Silva, R. B., M. N. Pereira, R. C. Araujo, W. R. Silva, and R. A. N. Pereira. 2020. A blend of essential oils improved feed efficiency and affected ruminal and systemic variables of dairy cows. *Transl. Anim. Sci.* 4:182–193. <https://doi.org/10.1093/tas/txz183>

Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.* 43:910–929. <https://doi.org/10.2527/jas1976.434910x>

Steele, M. A., J. Croom, M. Kahler, O. AlZahal, S. E. Hook, K. Plaizier, and B. W. McBride. 2011. Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300:R1515–R1523. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00120.2010>

Stone, W. C. 2004. Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 87:E13–E26. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70057-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70057-0)

Tekippe, J. A., R. Tacoma, A. N. Hristov, C. Lee, J. Oh, K. S. Heyler, T. W. Cassidy, G. A. Varga, and D. Bravo. 2013. Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:7892–7903. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7128>

Wang, M. Y., Y. Li, M. Gao, L. W. Song, M. Xu, X. L. Zhao, Y. Jia, M. Zhao, Y. Y. Sun, and H. L. Hu. 2021. Effects of subacute ruminal acidosis on colon epithelial morphological structure, permeability, and expression of key tight junction proteins in dairy goats. *J. Dairy Sci.* 104:4260–4270. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18738>

West, J. W. 2003. Effects of heat stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86:2131–2144. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73803-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X)

4 ARTIGO

EFFECT OF PHYTOGENIC FEED ADDITIVE, YEAST AND ORGANIC MINERALS ON DAIRY COWS SUBJECTED TO RUMINAL ACIDOSIS

ABSTRACT

A phytogenic feed additive (PHY), non-viable yeast and organic minerals can reduce ruminal acidosis in dairy cows subjected to slug-feeding. Fifteen Holstein cows (40.0 ± 6.9 kg/d, 103 ± 54 days in milk, 607 ± 81 kg) were fed a sequence of treatments, control (CTL), PHY [0.01 % of dry matter (DM) of Digestarom], and YOM (PHY + 0.075 % of DM of non-viable yeast + 0.15 % of DM of organic sources of S, Cu, Mn, Zn, Se) in 3×3 Latin squares with 35-d periods (22-d adaptations). Cows were milked 3 $\times$ /d and individually fed on a corn silage based total mixed ration with 31.2 % starch in DM. During days 29 and 32 of each period, feed was removed from each cow at 1900 h and cows were fed ad libitum at 0700 h of days 30 and 33 to induce slug-feeding. Data obtained over time during days 23 to 35 were analyzed as repeated measures with the MIXED procedure of SAS. The model had the effects of square, cow (square), period, treatment, day, and the interaction between treatment and day. Two contrasts were evaluated: 1) Phytogenic feed additive: CTL vs PHY+YOM and 2) Yeast + organic minerals: PHY vs YOM. Statistical significance was declared at $P \leq 0.05$ and tendency at $P \leq 0.10$. The ruminal acidosis induction protocol induced daily variation in most variables and there were very few treatment $\times$ day interactions. Feed restriction on days 29 and 32 induced spikes in dry matter intake (DMI) and in the duration of the first daily meal and reductions in milk yield, body weight, and ruminal pH on days 30 and 33. Cows fed PHY+YOM had higher DMI than cows fed CTL (23.7 vs 23.0 kg/d) and there was a tendency for YOM to increase DMI relative to PHY (23.9 vs 23.5 kg/d). Milk yield did not differ (33.0 kg/d), but energy-corrected milk (ECM) was higher on PHY+YOM than CTL

(31.9 vs 31.0 kg/d). The concentrations in milk of fat, preformed, mixed and de novo fatty acids were all increased by PHY+YOM relative to CTL. Cows fed PHY+YOM had higher daily rumination time than CTL. Milk composition of cows fed YOM did not differ from PHY. Ruminal pH measured at 30-min intervals, fermentation profile, microbial yield and fecal pH did not differ. The intake of digestible organic matter (DOMI) was increased on PHY+YOM relative to CTL and tended to be increased on YOM relative to PHY. The total-tract digestibility of DM and OM tended to be higher and jugular blood pH was lower on YOM than PHY. Cows fed PHY+YOM had higher partial pressure of CO₂ in venous blood than CTL. The second induction of slug-feeding (d 33) induced higher jugular blood pH and base excess than the first induction (d 30). Gut permeability evaluated by the plasma Cr concentration after pulse dosing Cr-EDTA into the rumen and blood serum lipopolysaccharide binding protein concentration did not differ. Cows fed the phytogenic feed additive (PHY+YOM) had greater DMI, DOMI, ECM, fat yield and rumination time than cows fed CTL without change in ruminal fermentation and gut permeability, and the supplementation of yeast + organic minerals (YOM) tended to increase DMI and diet digestibility relative to PHY.

Key words: essential oils, lactating cows, minerals, ruminal acidosis, rumen fermentation, yeast supplementation

INTRODUCTION

The occurrence of subacute ruminal acidosis (SARA) can have negative impacts on animal welfare and the economics of dairy farming (Golder and Lean, 2024). SARA can be caused by diets with low ratio of physically effective fiber to rapidly fermentable carbohydrates (Khorrami et al., 2021) or by nutritional management practices capable of

inducing ruminal VFA accumulation and low pH (Aschenbach et al., 2011; Melo et al., 2013), possibly affecting the digestive tract barrier function (Plaizier et al., 2022). The frequency of cows expressing one or multiples episodes of slug-feeding in dairy herds may increase in overcrowded barns with low feed bunk space per cow, when the grouping strategy does not separate primiparous from multiparous cows, or when there is inconsistent feed delivery (Stone, 2004). In such scenarios, management practices that cause cows to eat fewer, larger, or irregular meals may be associated with increased incidence of SARA (Krause and Oetzel, 2006). The supplementation of dairy cows with phytogenic feed additives, yeast and organic minerals may help in controlling SARA and is in accordance with the natural tendency of the consumers of dairy products.

Phytogenic feed additives comprise a diverse group of plant-derived compounds, including essential oils, oleoresins, and bioactive extracts, which have been proposed as functional alternatives to ionophores in ruminant diets. Essential oils can have ruminal and systemic action in dairy cows (Silva et al., 2020). Such feed additives are usually commercialized as blends of compounds, exploring the specific and synergistic effects of each component of the blend (Calsamiglia et al., 2007). The animal response to a specific blend may be dependent on the composition, dosage, and the degree of SARA challenge in the herd (Kröger et al. 2017). Any blend of feed additives requires experimental validation specific to the product.

A blend of phytogenic feed additives composed of spices, herbs and essential oils, mostly from mint, thyme, rosemary and clove (Digestarom[®]), has been evaluated as a tool to control SARA. This blend reduced the duration of ruminal pH < 6.0 and increased rumination time of non-lactating Holstein cows subjected to a ruminal acidosis induction protocol (Kröger et al., 2017). It affected ruminal pH, fermentation profile, LPS concentration and

microbiome during ruminal acidosis (Kröger et al., 2017; Neubauer et al., 2018; Humer et al., 2018) and improved the total tract NDF digestibility (Castillo-Lopez et al., 2022). The same blend was compared with monensin as a supplement to mid-lactation Holstein cows fed for 9 weeks on a 25.2 % starch diet (Poletti et al., 2025). It reduced DMI and increased ECM, due to increased milk fat secretion, and reduced serum haptoglobin concentration, without no detectable effect on ruminal pH or fermentation profile. The mode of action of a specific blend of feed additives may vary and more evidence of efficacy is needed on lactating dairy cows.

Yeast derived feed additives have been extensively evaluated to control SARA and to improve fiber digestibility in dairy cattle (Desnoyer et al., 2009). Metabolites from the cell content of non-viable *S. cerevisiae* can stimulate lactate consumers and fiber digesting microorganisms in the rumen (Callaway and Martin, 1997) and can increase meal frequency, which is thought to alleviate the acid load in the rumen (Bach et al., 2007). Although live viable yeast cells are commonly found in the rumen and feces of ruminants, especially on those fed silages (Fernandes et al., 2019; Sales et al., 2023), non-viable yeast supplementation can improve milk yield and components of dairy cows (Dias et al., 2018), especially in early lactation (Poppy et al., 2012). In addition, organic minerals can affect ruminal function and mineral bioavailability (Weiss and Hansen, 2024), especially during periods of increased metabolic demand (Lopreiato et al., 2020; McKnight et al., 2025), suggesting that the association of non-viable yeast and organic minerals with phytogetic feed additives may improve the efficacy of the blend.

The objective of this experiment was to evaluate the effect of a blend of phytogetic feed additives alone or added of non-viable yeast and organic sources of S, Cu, Mn, Zn, Se on lactation performance, DMI, feed efficiency, milk fatty acids, chewing behavior, ruminal

fermentation and microbial yield, blood acid-base balance, the total tract diet digestibility and gut permeability of dairy cows subjected to a ruminal acidosis induction protocol. The goal of the protocol was to simulate a scenario of feed restriction inducing slug-feeding of a high starch diet twice within a 3-d interval. Our hypothesis was that the blend of phytogenic feed additives would reduce SARA and improve DMI, digestibility and lactation performance and the addition of yeast and organic minerals would improve the efficacy relative to the blend alone.

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedures were approved by the University of Lavras Bioethic Committee in Utilization of Animals (Protocol 039/25). There was no case of clinical (acute, lactic) ruminal acidosis during the experiment.

Experimental design, cows and treatments

Fifteen Holstein cows (40.0 ± 6.9 kg/d milk yield, 103 ± 54 days in lactation, 607 ± 81 kg body weight, 6 primiparous) were used in the experiment. Cows formed 5 Latin squares of 3 cows each based on parity (1 vs. >1) and similarity in milk yield and days in lactation. Within each square, cows were randomly assigned to a sequence of 3 dietary treatments following a 3×3 Latin square design. Experimental periods lasted 35 d, consisting of 22 d of treatment adaptation followed by 13 d of data collection. Treatments were control (CTL), phytogenic feed additive included at 0.01% of diet DM (PHY. Digestarom[®], dsm-firmenich), and YOM consisting of PHY plus 0.075% of diet DM of non-viable *S. cerevisiae* yeast (RumenYeast[®], ICC Brazil) and 0.15% of diet DM of organic minerals (dsm-firmenich. 89.58 g/kg S, 1334 mg/kg Cu, 3334 mg/kg Mn, 85.5 mg/kg Se, and 6666 mg/kg Zn).

Cows were individually fed in an open walled, sand-bedded tie stall barn with fans and high-pressure sprinklers and were milked 3 ×/d starting at 0500, 1200, and 1900 h, in an

adjacent herringbone parlor. A TMR was mixed 1 ×/d in a 1.2-m³ stationary vertical mixer (Unimix 1200, Casale) and cows were fed at 0700 h. Feed was pushed up manually with a broom at least 10 ×/d.

During d 29 and 32 of each experimental period, feed was removed from each cow at 1900 h (at the start of the 3rd milking) and cows were fed *ad libitum* at 7:00 h of the next day (after returning from the 1st milking) to induce slug-feeding and ruminal acidosis on days 30 and 33. Feed refusals were targeted at 10 to 15% of the as-fed intake per cow per day (daily refusal during the experiment was 13.4 ± 2.8 % of offered), except on feed restriction days. Samples of rehydrated and ensiled corn grain and corn silage were collected weekly for DM determination with a microwave oven (by drying for 5 min, and then in 3-min steps until a stable weight was obtained). Diets were adjusted accordingly by modifying the amount of each feed ingredient to maintain their proportions constant on a DM basis.

Feed sampling and analysis

Samples of feed ingredients and orts per cow were collected daily and frozen and composite samples of d 22 to 35 were formed per period. Samples were dried in a forced-air oven at 55°C for 72 h and ground to pass a 1-mm diameter mesh screen (Star FT 80, Fortinox Indústria, Comércio e Serviços). The DM concentration was determined in a forced-air oven at 105°C for 24 h and ash was evaluated by incineration at 600°C for 4 h. The CP concentration was determined with a micro Kjeldahl steam distillatory (Tecnal; method 990.03; AOAC International, 2006). The NDF concentration was evaluated using an adaptation of AOAC International (2006) method 2002–04 (Mertens, 2002), with heat-stable α -amylase (Termamyl, Novozymes), without sodium sulfite, and were manually filtered using crucibles. Starch was measured with α -amylase and amyloglucosidase and colorimetry, as described in Fernandes et al. (2022), adapted from Hall et al. (2015). The composition of

the offered TMR in ingredients and the daily intake of DM were calculated. The nutrient composition of the consumed TMR from d 22 to 35 in each period was calculated by the total nutrient intake of all cows on a treatment divided by the total DMI of the treatment. The diets were formulated aiming at high starch concentration (average of 31.2 % of DM) and with whole plant corn silage as the only forage source to increase the propensity of SARA (Table 1).

Lactation performance, intake, body weight, first meal duration and rumination

Milk yield and DMI were recorded daily throughout the experiment and data from d 23 to 35 of each experimental period were used to compare treatments. On d 25 to 35 of each period, 0.5% of the milk produced in each milking was collected, and a composite daily sample from the 3 milkings was formed per cow. Composite samples were stored in flasks containing 2-bromo-2-nitropropane-1–3 diol under refrigeration. All composite samples (11 samples/cow/period) were sent to a commercial laboratory (Laboratory of the Paraná State Holstein Breeders Association, Curitiba, Brazil), and the concentrations of crude protein, casein, fat, lactose, total solids, somatic cells (SCC), milk urea-N (MUN), and fatty acids (FA) were analyzed by mid-infrared analysis (model 2000; Bentley Instruments Inc.). Milk energy secretion (Mcal/d) was calculated (NASEM, 2021): $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ CP}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$. The yield 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). Feed efficiencies were calculated as milk yield/DMI and ECM/DMI.

Body weight was measured immediately after the morning milking from d 26 to 35 of each period with an individual walk-over weigh scale (Eziweigh 2, Tru-Test), and BCS (1 to 5, thin to fat; Wildman et al., 1982) was the mean of 3 independent evaluators on d 35 of each period. The duration of the first daily meal (conditioned meal) was measured with a

chronometer from d 26 to d 35. Evaluators observed the behavior of all cows after offering feed at 0700 h until the last cow finished its first meal. Rumination time (min/d) was measured with neck accelerometers and algorithms (CowMed. Chip Inside Tecnologia S.A, Santa Maria, Brazil). The 24 h daily rumination time of each cow started at 07:00 h (feeding time).

Digestibility, gut permeability, ruminal microbial yield and fecal viscosity and pH

During d 26 to 28 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. During data collection, cows were moved in groups of 3 to the milking routine and immediately returned to their tie stalls after milking to reduce the daily time without sampling. The milking routine of each group of 3 cows lasted less than 20 min. Fecal samples were immediately weighed and subsamples (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 and ash were measured as previously described for feed analysis. The total tract apparent digestibility of DM, OM and NDF were calculated. Digestible OM intake (DOMI) was estimated ($\text{OM intake} \times \text{OM digestibility}$) 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 and were 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). Allantoin was analyzed

according to Chen and Gomes (1992). The relative efficiency of ruminal microbial growth was estimated as allantoin/DOMI (mmol/kg).

Spot fecal samples were collected from each cow 12 h after morning feeding on d 28. Fecal samples were frozen at -20°C until viscosity and pH measurements. 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 30s 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).

Gut permeability was evaluated in vivo using Cr-EDTA as a paracellular permeability marker as previously described by Wood et al. (2015). After morning milking on d 35 of each period, a 180 mM solution of Cr-EDTA (1.5 L) was pulse dosed into the rumen using a flexible oro-gastric tube. Blood samples were collected at times 1, 4, 8, 12, and 24 h relative to the infusion with tubes containing K₂EDTA (Becton, Dickinson and Co., reference no. 368381; plasma for trace element analysis). Plasma was harvested following centrifugation at 1,500 ×g for 15 min at 4°C and subsequently frozen at -20°C until analysis. Total chromium in plasma was analyzed by inductively coupled plasma triple quadrupole (ICP-MS) (Agilent 8900, Agilent Technologies).

Plasma concentration of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) was determined on days 29 and 35 with a commercially available ELISA kit (HK503, Hycult Biotech, Uden, the

Netherlands), according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader.

Ruminal fermentation

Ruminal fluid samples were obtained before slug feeding (d 28) and during the second episode of slug-feeding (d 33), 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), with a capillary column [CP-Wax 58 (FFAP) CB. Varian Analytical Instruments]. 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 (Moonsyst bolus and IOT Gateway. Agri IOT Limited, Kilkenny, Ireland) 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 23 to 34 of each period were used for treatment comparisons.

Blood acid-base balance

On d 30 and 33 of each period the jugular blood acid-base balance was evaluated 8 h after feeding with a Cobas b 121 blood gas analyzer (Roche Diagnóstica Brasil Ltda). 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.

Statistical analysis

Data were analyzed using the PROC MIXED procedure of SAS (SAS Institute Inc.). Daily data from day 23 to 35 of each experimental period were analyzed as repeated measures over time, except for variables measured once per period. The statistical model included the effects of square (1 to 5) and cow nested within square (1 to 15), period (1 to 3), treatment (CTL, PHY, YOM), day (23 to 35), and the interaction treatment $\times$ day. The interaction of cow, period and treatment was defined as random to evaluate the whole plot treatment effect. Treatments were compared with two single degrees of freedom orthogonal contrasts: 1) Phytogenic feed additive: CTL vs PHY+YOM, and 2) Yeast + organic minerals: PHY vs YOM. Statistical significance was declared at $P \leq 0.05$ and tendency at $P \leq 0.10$.

RESULTS

Lactation performance, intake, body weight, first meal duration and rumination

Table 2 reports DMI, lactation performance, milk fatty acids, urea-N (MUN) and SCC, feed efficiency, BW, BCS and first meal duration. There was no significant treatment $\times$ day interaction for the variables evaluated ($P \geq 0.33$), whereas significant day effects were observed for all variables ($P < 0.01$). Night feed restriction followed by next-day slug-feeding caused mean DMI to vary by about 12 kg/d and milk yield by 6 kg/d during the final 13 days of each experimental period (Figure 1). The BW decreased on days 30 and 33 during slug-feeding, while the duration of the first meal was extended on these same days (Figure 1).

Cows fed the phytogenic feed additive (contrast PHY+YOM) had greater DMI than CTL (+0.7 kg/d; $P < 0.01$), with a tendency for higher DMI on treatment YOM compared with PHY (+0.4 kg/d; $P = 0.10$). The average intake of the phytogenic feed additive was 2.35

g/d on PHY and 2.39 g/d on YOM. The average intake of yeast was 17.93 g/d and organic minerals were 35.86 g/d on treatment YOM. Cows fed PHY+YOM were 8 kg heavier than cows fed CTL ($P < 0.01$), but BCS did not differ ($P \geq 0.85$), likely reflecting differences in digesta gut fill. Rumination time was increased by PHY+YOM relative to CTL (489 vs 471 min/d, $P < 0.01$). There was a tendency ($P = 0.10$) for cows fed YOM to require less rumination time per unit of mean ruminal pH than PHY.

Milk yield did not differ among treatments (mean = 33.0 kg/d; $P \geq 0.18$). However, ECM was increased on cows fed PHY+YOM relative to CTL (+0.9 kg/d; $P < 0.01$). Milk fat concentration was increased by PHY+YOM relative to CTL (+0.10 % of milk; $P < 0.01$) and there was also a tendency for higher fat yield (+44 g/d, $P = 0.07$). Milk fat yield and concentration of non-supplemented cows (CTL) were lowest most of the time (Figure 2). All FA groups (preformed, mixed and de novo) measured as g/100 g of milk and g/d were increased by PHY+YOM relative to CTL ($P \leq 0.05$), however milk FA profile measured as g/100 g FA did not differ ($P \geq 0.41$), suggesting that the phytogenic feed additive was beneficial to mammary gland synthesis of short-chain FA and also to the uptake of long-chain FA. The FA concentration in milk over time is reported in Figure 3. After the first slug-feeding episode, both preformed and mixed fatty acids decreased, but they increased following the second slug-feeding episode. De novo FA in milk was highest on PHY during d 29 and lowest on CTL during d 31.

There was a tendency for PHY+YOM to increase lactose concentration in milk relative to CTL ($P = 0.06$), but no significant effect was detected on lactose yield ($P = 0.11$). Milk TS yield and concentration were both increased by PHY+YOM relative to CTL ($P \leq 0.02$). Milk composition and FA profile of cows fed YOM did not differ of cows fed PHY ($P \geq$

0.14). Feed efficiency (Milk/DMI and ECM/DMI), MUN, SCC and first meal duration did not differ ($P \geq 0.21$).

Ruminal fermentation

Ruminal fermentation is described in Table 3. Treatments had no effect on ruminal VFA molar proportions, protozoa concentration, microbial yield estimated by the urinary allantoin excretion, and pH measured continuously with reticular probes ($P \geq 0.21$). Ruminal fluid was sampled before (d 28) and during (d 33) the second induction of slug-feeding. A significant day effect ($P < 0.01$) was detected for all variables describing ruminal fermentation, except protozoa concentration and time of $\text{pH} \leq 5.8$ ($P \geq 0.31$). Significant interactions treatment $\times$ day were detected for pH range and maximum pH ($P \leq 0.04$). The range between the maximum and minimum daily pH was highest on cows fed CTL on days 25, 26 and 34 and was similar in all treatments on the other days (Figure 4). The mean pH was highest on d 29 (first feed restriction) and the drop in mean pH was more accentuated following the first (d 30 and 31) than the second feed restriction (d 33 and 34). The duration of ruminal $\text{pH} \leq 6.2$ was increased during the days of slug-feeding (d 30 and 33) and it was highest on CTL on d 25 and 26 (Figure 4). The circadian variation in ruminal pH before and during the induction of ruminal acidosis is shown in Figure 5. Minimum pH occurred around 12 h post-feeding and feed restriction and subsequent slug-feeding induced larger change in pH pattern from one day to the other (Panel B. Figure 5) than observed before the induction of ruminal acidosis (Panel A. Figure 5).

All VFA molar proportions in ruminal fluid were affected by the day of measurement (Figure 6). Before the induction of ruminal acidosis (d 28) acetate, butyrate and isovalerate molar proportions were higher and propionate, isobutyrate and valerate were lower than

during the second induction of slug-feeding (d 33). The acetate to propionate ratio was reduced during slug-feeding.

Jugular blood acid-base balance

No treatment $\times$ day interaction ($P \geq 0.11$) was detected for blood acid–base variables measured during the two days of slug-feeding (d 30 and 33) (Table 4). Cows fed YOM had lower blood pH compared with cows fed PHY ($P = 0.02$), whereas blood pH did not differ on CTL relative to PHY+YOM ($P = 0.27$). The partial pressure of CO₂ (pCO₂) was higher in cows fed PHY+YOM than CTL ($P = 0.03$) and total CO₂ tended ($P = 0.10$) to follow the same trend. The YOM treatment reduced SatO₂ relative to PHY ($P = 0.04$).

Day of measurement significantly affected blood pH, bicarbonate, total CO₂, SatO₂, and base excess ($P \leq 0.02$). Blood pH and base excess were higher on day 33 than on day 30 (Figure 7), suggesting that the first slug-feeding episode caused a greater acid–base disturbance than the second.

Diet Digestibility, Fecal viscosity and pH. and gut permeability

The total-tract apparent digestibility of DM and OM (Table 5) tended to be increased on cows fed YOM relative to PHY ($P \leq 0.09$), but PHY+YOM did not differ from CTL ($P \geq 0.75$). The intake of digestible OM (DOMI) was increased by PHY+YOM relative to CTL ($P = 0.04$) and there was a tendency for higher DOMI on YOM than PHY ($P = 0.06$). The efficiency of energy utilization, expressed as ECM/DOMI, was lower on YOM compared with PHY ($P = 0.03$). The total-tract digestibility of NDF and starch and fecal pH and viscosity did not differ ($P \geq 0.19$). The digestibility of the non-NDF, non-starch OM (an indirect measure of CP + residual OM + lipids) was increased by YOM relative to PHY (76.9 vs 72.8 % of intake, $P = 0.01$).

The markers of gut permeability plasma Cr concentration and blood serum LBP did not differ by treatment (Table 5, $P \geq 0.34$). Plasma Cr concentration increased after infusion, peaked at 8 h post-infusion, and declined thereafter, regardless of treatment (Figure 8). Plasma Cr concentration at 4 h post-infusion was highest on cows fed CTL and lowest on cows fed PHY ($P < 0.05$ for Slice of SAS). Serum LBP was higher after the induction of acidosis (d 35) than before acidosis (d 29) (6.06 vs 4.99 $\mu\text{g/mL}$, $P = 0.02$).

DISCUSSION

Day Effect and Physiological Responses to Repeated Acidotic Challenges

The slug-feeding protocol, consisting of feed restriction followed by ad libitum refeeding, induced marked day effects across most measured variables, confirming that the feeding challenge successfully imposed a transient acidotic condition. Changes in dry matter intake, milk yield, milk fat secretion, rumination behavior, ruminal pH dynamics, VFA profile, blood acid–base balance, and plasma LBP were consistently associated with the timing of the feeding challenge, indicating that the responses observed were primarily driven by feeding management rather than treatment effects.

These responses are consistent with the rapid accumulation of fermentation end-products following increased intake of fermentable substrate after restriction, resulting in reductions in ruminal pH and coordinated physiological responses. In SARA models, such changes are associated with alterations in microbial activity, epithelial function, and systemic responses (Plaizier et al., 2009; Plaizier et al., 2022). In addition, low ruminal pH combined with high concentrations of organic acids can affect epithelial integrity and absorption processes, contributing to systemic acid–base disturbances (Aschenbach et al., 2019). Thus, the combined changes observed in intake, rumination, milk production, and blood variables reflect an integrated physiological response to the feeding challenge.

Although ruminal pH dynamics confirmed that both slug-feeding episodes induced acidotic conditions, summary pH variables did not indicate a clear difference in the magnitude of pH depression between challenges. However, systemic variables differed between days, as indicated by higher blood pH and base excess during the second challenge, suggesting a reduced systemic acid load. This indicates that the physiological response was not identical between repeated challenges, even in the absence of clear differences in summarized ruminal pH variables.

This interpretation is consistent with intermittent SARA models. Kröger et al. (2017) reported greater pH depression and reduced rumination during the first high-concentrate challenge compared with the second, whereas Neubauer et al. (2018) showed that changes in ruminal microbial activity and fermentation were more pronounced during the initial challenge. Similarly, Humer et al. (2018) demonstrated that ruminal LPS concentrations and systemic metabolic disturbances were greater during the early phase of SARA induction. Together, these studies support the interpretation that repeated intermittent challenges can lead to attenuated physiological responses over time.

In contrast, Castillo-Lopez et al. (2022) reported progressive changes in ruminal fermentation and nutrient digestibility under continuous high-concentrate feeding, indicating that the response to acidotic conditions depends on the temporal structure of the challenge. In the present study, the intermittent nature of the slug-feeding model likely allowed partial recovery between challenges, limiting the accumulation of effects observed under continuous exposure.

Plasma LPS-binding protein (LBP) was affected by day, reflecting differences between sampling conditions before and during the feeding challenge. Because LBP was measured at specific time points rather than continuously, the present data indicate a response associated

with the challenge rather than cumulative changes over time. The increase in LBP observed under challenge conditions is consistent with grain-based SARA models, in which endotoxin exposure is associated with increased circulating LBP (Li et al., 2010; Li et al., 2012). In addition, feed restriction itself has been shown to influence gut permeability and inflammatory responses (Goetz et al., 2024), suggesting that both restriction and refeeding contributed to the observed response. The absence of treatment effects on LBP indicates that supplementation did not modulate systemic inflammatory responses under the conditions of this experiment, which is consistent with previous reports showing variable responses of inflammatory markers to gastrointestinal challenges (Abeyta et al., 2023).

Overall, the day effects observed indicate that slug-feeding induced transient disturbances in ruminal and systemic physiology, with evidence of partial adaptation between repeated challenges, particularly at the systemic level.

Effects of Supplementation

Despite the strong day effects, treatment influenced overall intake and productive performance across the experimental period. Cows fed PHY+YOM had greater dry matter intake, energy-corrected milk, milk fat yield, and total solids yield compared with control cows. These responses were accompanied by greater secretion of preformed, mixed, and de novo fatty acids, without changes in their relative proportions, indicating that the increase in milk fat output was quantitative rather than associated with changes in lipid metabolism pathways.

The increase in milk fat yield observed in cows fed PHY+YOM occurred in parallel with greater dry matter intake and digestible organic matter intake, indicating increased nutrient availability to support milk fat synthesis. A similar pattern was reported by Poletti et al. (2025), who observed increased milk fat yield and energy-corrected milk with

phytogenic supplementation in lactating dairy cows, without changes in ruminal pH or VFA profile. These findings indicate that improvements in milk fat production can occur independently of detectable changes in bulk ruminal fermentation. In ruminants, milk fat synthesis is closely associated with nutrient intake and energy balance, as well as the supply of fermentation-derived substrates and circulating fatty acids (Calsamiglia et al., 2007). However, given the absence of changes in ruminal fermentation variables in the present study, the results support the interpretation that increased intake and nutrient availability, rather than alterations in fermentation pathways, were the primary factors associated with the observed response. The lack of changes in fatty acid proportions further supports that ruminal biohydrogenation pathways were not markedly altered.

The increase in rumination time observed with PHY+YOM is consistent with the greater dry matter intake and may have contributed to the maintenance of ruminal conditions during feeding events. Increased rumination is associated with greater saliva production and buffering capacity, which can support ruminal stability. Although mean ruminal pH variables were not affected by treatment in the present study, similar increases in rumination have been reported by Kröger et al. (2017) under phytogenic supplementation, suggesting that behavioral responses may contribute to maintaining ruminal conditions under feeding challenges.

Cows fed PHY+YOM also had greater digestible organic matter intake, and the inclusion of yeast and organic minerals (YOM) tended to increase intake and improved the digestibility of non-NDF-starch organic matter compared with PHY alone. Although the mechanisms were not directly evaluated, previous studies have shown that dietary interventions can influence ruminal microbial activity and nutrient digestion (Neubauer et al., 2018; Humer et al., 2018). However, given the absence of changes in ruminal pH, VFA,

and microbial yield in the present study, these results indicate that improvements in digestibility likely occurred without major alterations in overall fermentation patterns.

The absence of treatment effects on ruminal fermentation variables indicates that the additives did not alter the overall fermentation profile under the conditions imposed. This contrasts with studies conducted under more severe or continuous acidotic challenges, in which phytogenic supplementation altered fermentation, microbial populations, and metabolite production (Kröger et al., 2017; Neubauer et al., 2018; Humer et al., 2018). The lack of similar responses in the present study likely reflects differences in challenge severity, feeding pattern, and physiological status.

Similarly, Castillo-Lopez et al. (2022) reported changes in fermentation and digestibility under prolonged high-concentrate feeding, reinforcing that the response to phytogenic additives depends on the duration and intensity of the challenge. Under the moderate and transient conditions of the present study, improvements in intake and production occurred without detectable changes in ruminal fermentation.

The absence of overall treatment differences in plasma Cr area under the curve (AUC) suggests that the supplementation did not substantially alter total-tract gut permeability. However, cows fed the phytogenic additive (PHY+YOM) exhibited lower plasma Cr concentration at 4 h post-dosing ($P < 0.05$), indicating a potential modest improvement in barrier function during the period of peak paracellular absorption.

This result should be interpreted cautiously. Although the Cr-EDTA technique is a well-established in vivo marker of intestinal permeability, it presents important limitations, such as influence of rumen retention time, passage rate, and renal clearance, which can reduce its sensitivity to detect subtle treatment effects (Horst et al., 2020; Goetz et al., 2024).

Therefore, the lack of difference in total AUC does not completely rule out a localized or transient beneficial effect of the phytogenic on epithelial integrity.

The improvements in dry matter intake, energy-corrected milk, and rumination time observed with PHY+YOM were likely driven primarily by increased nutrient availability and possible extra-ruminal effects on feeding behavior and epithelial efficiency, rather than by large changes in gut permeability. Future studies should employ more frequent sampling points, complementary techniques (e.g., urinary Cr recovery, tight junction protein gene expression, or histological assessment of the ruminal and intestinal epithelium), and different challenge models to better clarify the potential effects of phytogenic additives on gastrointestinal barrier function.

Overall, phytogenic supplementation improved intake, rumination, nutrient supply, and milk energy output without altering ruminal fermentation or systemic inflammatory indicators. The inclusion of yeast and organic minerals provided additional benefits in intake and digestibility, supporting the use of combined supplementation strategies under conditions of irregular feeding and transient acidotic challenges.

CONCLUSION

The induction of slug-feeding following feed restriction induced daily variation in most variables and there were very few treatment $\times$ day interactions. The first induction of ruminal acidosis by slug-feeding was apparently more challenging on the cows than the second episode.

Cows fed the phytogenic feed additive (PHY+YOM) had higher DMI, ECM, fat yield, rumination time and energy intake (DOMI) than cows fed CTL. The supplementation of yeast + organic minerals (YOM) tended to increase DMI and diet digestibility over PHY alone. Overall, the results indicate that phytogenic-based supplementation can enhance DMI and

milk energy output, while adding yeast + organic minerals could further improve diet digestibility, DMI and DOMI.

REFERENCES

Abeyta, M. A., E. A. Horst, B. M. Goetz, E. J. Mayorga, S. Rodriguez-Jimenez, M. Caratzu, and L. H. Baumgard. 2023. Effects of hindgut acidosis on production, metabolism, and inflammatory biomarkers in previously immune-activated lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 106:4324–4335. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22689>

AOAC International. 2006. *Official Methods of Analysis*. 18th ed. AOAC Int., Gaithersburg, MD.

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>

Aschenbach, J. R., G. B. Penner, F. Stumpff, and G. Gäbel. 2011. 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>

Bach, A., C. Iglesias, and M. Devant. 2007. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136:146–153. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.09.011>

Callaway, E. S., and S. A. Martin. 1997. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80:2035–2044. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76148-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76148-4)

Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90:2580–2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>

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 Resour. Unit, Rowett Res. Inst., Aberdeen, UK.

Castillo-Lopez, E., R. Rivera-Chacon, S. Ricci, N. Reisinger, and Q. Zebeli. 2022. Changes in fermentation profile of the reticulorumen and hindgut, and nutrient digestion in dry cows fed concentrate-rich diets supplemented with a phytogenic feed additive. J. Dairy Sci. 105:5747–5760. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21786>

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>

Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, G. Bertin, C. Duvaux-Ponter, and D. Sauvant. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. J. Dairy Sci. 92:1620–1632. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1414>

Dias, A. L. G., J. A. Freitas, B. Micai, R. A. Azevedo, L. F. Greco, and J. E. P. Santos. 2018. Effects of supplementing yeast culture to diets differing in starch content on performance and feeding behavior of dairy cows. J. Dairy Sci. 101:186–200. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13240>

Fernandes, T., D. 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>

Fernandes, T., B. F. Carvalho, H. C. Mantovani, R. F. Schwan, and C. L. S. Ávila. 2019. Identification and characterization of yeasts from bovine rumen for potential use as probiotics. *J. Appl. Microbiol.* 127:845–855. <https://doi.org/10.1111/jam.14350>

Goetz, B. M., M. A. Abeyta, S. Rodriguez-Jimenez, J. Opgenorth, J. L. McGill, S. R. Fensterseifer, R. P. Arias, A. M. Lange, E. A. Galbraith, and L. H. Baumgard. 2024. Effects of a multistrain *Bacillus*-based direct-fed microbial on gastrointestinal permeability and biomarkers of inflammation during and following feed restriction in mid-lactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 107:6192–6210. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24352>

Horst, E. A., S. K. Kvidera, and L. H. Baumgard. 2020. Evaluating effects of zinc hydroxychloride on biomarkers of inflammation and intestinal integrity during feed restriction. *J. Dairy Sci.* 103:11911–11929. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18860>

Golder, H. M., and I. J. Lean. 2024. Invited review: Ruminal acidosis and its definition—A critical review. *J. Dairy Sci.* 107:10066–10098. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-24817>

Hall, M. B., J. Arbaugh, K. Binkerd, A. Carlson, T. Doan, T. Grant, C. Heuer, H. D. Inerowicz, B. Jean-Louis, R. Johnson, J. Jordan, D. Kondratko, E. Maciel, K. McCallum, D. Meyer, C. A. Odijk, A. Parganlija-Ramic, T. Potts, L. Ruiz, S. Snodgrass, D. Taysom, S. Trupia, B. Steinlicht, and D. Welch. 2015. Determination of dietary starch in animal feeds and pet food by an enzymatic-colorimetric method: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 98:397–409. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-012>

Humer, E., I. Kröger, V. Neubauer, K. Schedle, N. Reisinger, and Q. Zebeli. 2018. Supplementing phytogenic compounds or autolyzed yeast modulates ruminal biogenic

amines and plasma metabolome in dry cows experiencing subacute ruminal acidosis. *J. Dairy Sci.* 101:9559–9574. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14744>

Khorrani, B., R. Khiaosa-ard, and Q. Zebeli. 2021. Models to predict the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cows based on dietary and cow factors: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 104:7761–7780. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19890>

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.S0022-0302\(05\)73048-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73048-4)

Krause, K. M., and G. R. Oetzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:215–236. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.004>

Kröger, I., E. Humer, V. Neubauer, N. Reisinger, S. Aditya, and Q. Zebeli. 2017. Modulation of chewing behavior and reticular pH in nonlactating cows challenged with concentrate-rich diets supplemented with phytogenic compounds and autolyzed yeast. *J. Dairy Sci.* 100:9702–9714. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12755>

Li, S., E. Khafipour, D. O. Krause, J. C. Rodriguez-Lecompte, and J. C. Plaizier. 2010. Free endotoxins in the feces of lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 90:591–594. <https://doi.org/10.4141/CJAS10017>

Li, S., E. Khafipour, D. O. Krause, A. Kroeker, J. C. Rodriguez-Lecompte, G. N. Gozho, and J. C. Plaizier. 2012. Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:294–303. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4447>

Lopreiato, V., M. Mezzetti, L. Cattaneo, G. Ferronato, A. Minuti, and E. Trevisi. 2020. Role of nutraceuticals during the transition period of dairy cows: A review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 11:96. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00501>

McKnight, M. G., K. M. Harvey, W. I. Jumper, J. Ranches, and B. B. Karisch. 2025. Trace mineral supplementation via organic or inorganic sources for beef cattle during preconditioning and feedlot receiving: A systematic review and meta-analysis. *Transl. Anim. Sci.* 9:txaf119. <https://doi.org/10.1093/tas/txaf119>

Melo, L. Q., S. F. Costa, F. Lopes, M. C. Guerreiro, L. E. Armentano, and M. N. Pereira. 2013. Rumen morphometrics and the effect of digesta pH and volume on volatile fatty acid absorption. *J. Anim. Sci.* 91:1775–1783. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4999>

Mertens, D. R., M. Allen, J. Carmany, J. Clegg, A. Davidowicz, M. Drouches, K. Frank, D. Gambin, M. Garkie, B. Gildemeister, D. Jeffress, C. S. Jeon, D. Jones, D. Kaplan, G. N. Kim, S. Kobata, D. Main, X. Moua, B. Paul, J. Robertson, D. Taysom, N. Thiex, J. Williams, and M. Wolf. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 85:1217–1240. <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.6.1217>

NASEM (Natl. Acad. Sci. Eng. Med.). 2021. Nutrient requirements of dairy cattle. 8th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Neubauer, V., R. Petri, E. Humer, I. Kröger, E. Mann, N. Reisinger, M. Wagner, and Q. Zebeli. 2018. High-grain diets supplemented with phytogenic compounds or autolyzed yeast modulate ruminal bacterial community and fermentation in dry cows. *J. Dairy Sci.* 101:2335–2349. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13565>

Plaizier, J. C., F. J. Mulligan, E. W. Neville, L. L. Guan, M. A. Steele, and G. B. Penner. 2022. Invited review: Effect of subacute ruminal acidosis on gut health of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 105:7141–7160. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21960>

Poletti, G., N. T. S. Grigoletto, C. S. Takiya, A. T. Nunes, V. V. de Carvalho, C. S. Cortinhas, T. D. Turner, and F. P. Rennó. 2025. Effects of monensin, phytogenic compounds, or a blend of feed additives on health and performance of dairy cows. *Transl. Anim. Sci.* 9:txaf140. <https://doi.org/10.1093/tas/txaf140>

Sales, G. F. C., B. F. Carvalho, R. F. Schwan, M. A. Silva, A. C. Dias, and C. L. S. Ávila. 2023. Diversity and probiotic characterisation of yeast isolates in the bovine gastrointestinal tract. *Antonie Van Leeuwenhoek* 116:1123–1137. <https://doi.org/10.1007/s10482-023-01865-6>

Silva, R. B., M. N. Pereira, R. C. de Araujo, W. R. Silva, and R. A. N. Pereira. 2020. A blend of essential oils improved feed efficiency and affected ruminal and systemic variables of dairy cows. *Transl. Anim. Sci.* 4:182–193. <https://doi.org/10.1093/tas/txz183>

Stone, W. C. 2004. Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 87:E13–E26. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70057-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70057-0)

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>

Weiss, W. P., and S. L. Hansen. 2024. Invited review: Limitations to current mineral requirement systems for cattle and potential improvements. *J. Dairy Sci.* 107:10099–10114. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25150>

Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, J. H. F. Troutt Jr., and T. N. Lesch. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to standard production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495–501.

Wood, K. M., S. L. Evans, and G. B. Penner. 2015. The influence of age and weaning on permeability of the gastrointestinal tract in Holstein bull calves. *J. Dairy Sci.* 98:7226–7237. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9393>

TABLES AND FIGURES

Table 1. Ingredients, nutrients and particle size of experimental diets

	CTL ¹	PHY	YOM
Ingredients, % of DM			
Corn silage	55.0	55.0	55.0
Whole cottonseeds	10.1	10.1	10.1
Soybean meal	16.6	16.6	16.6
Rehydrated and ensiled corn grain	7.6	7.6	7.5
Finely ground corn	7.6	7.6	7.4
Limestone	0.31	0.30	0.31
Magnesium oxide	0.26	0.26	0.27
Sodium bicarbonate	0.97	0.97	1.01
Minerals and vitamins ²	1.50	1.50	1.51
Phytogetic feed additive ³		0.01	0.01
Yeast ⁴			0.075
Organic minerals ⁵			0.15
Rumen protected Met ⁶	0.06	0.06	0.06
DM, % of as-fed	50.3	50.3	50.3
Nutrients, % of DM			
CP	16.9	17.0	17.0
NDF	32.5	32.6	32.6
Ether extract	4.3	4.3	4.3
Ash	6.0	5.9	6.0
Starch	31.3	31.2	31.1
NFC ⁷	40.4	40.2	40.2
Particle distribution, ⁸ % of as-fed			
Feed particles > 19 mm	4.2 ± 0.98	4.6 ± 0.99	4.5 ± 0.97
Feed particles 8-19 mm	50.4 ± 1.59	50.1 ± 1.84	50.3 ± 1.94
Feed particles < 8 mm	45.4 ± 1.83	45.3 ± 1.95	45.3 ± 2.13

¹ CTL = Control. PHY = Digestarom. YOM = Digestarom, organic minerals and yeast

² Bovigold = Ca 231 g/kg, P 40 g/kg, Mg 25 g/kg, K 10 g/kg, S 20 g/kg, Na 70 g/kg, Cl 108 g/kg, Co 15 mg/kg, Cu 750 mg/kg, Mn 2,000 mg/kg, Zn 2,850 mg/kg, Se 22 mg/kg, I 40 mg/kg, Cr 20 mg/kg, Vit A 350 KUI/kg, Vit D 100 KUI/kg, Vit E 2 KUI/kg

³ Digestarom (DSM)

⁴ RumenYeast (ICC)

⁵ Organic minerals (DSM) = S 89.58 g/kg, Cu 1,334 mg/kg, Mn 3,334 mg/kg, Se 83.5 mg/kg and Zn 6,666 mg/kg

⁶ Mepron (Evonik)

⁷ Non-fiber carbohydrates = 100 – (CP + NDF + ether extract + ash)

⁸ Penn State Particle Separator. Mean ± SD (Days 22 to 35)

Table 2. Dry matter intake (DMI), lactation performance, milk fatty acids, urea-N (MUN) and somatic cell count (SCC), feed efficiency, body weight (BW) and condition score (BCS), first meal duration and rumination¹.

	Treatment ²			SEM ³	P-value ⁴	
	CTL	PHY	YOM		CTL vs PHY+YOM	PHY vs YOM
kg/d						
DMI	23.0	23.5	23.9	0.17	<0.01	0.10
Milk	32.7	33.1	33.1	0.24	0.18	0.91
ECM ⁵	31.0	31.8	32.0	0.26	<0.01	0.74
Fat	1.098	1.143	1.141	0.0183	0.07	0.94
Protein	1.019	1.031	1.042	0.0096	0.14	0.44
Casein	0.810	0.820	0.830	0.0076	0.11	0.38
Lactose	1.513	1.538	1.542	0.0139	0.11	0.85
Total solids	3.935	4.026	4.042	0.0340	0.02	0.73
% of milk						
Fat	3.39	3.49	3.48	0.023	<0.01	0.72
Protein	3.14	3.14	3.16	0.011	0.37	0.17
Casein	2.49	2.49	2.51	0.009	0.29	0.14
Lactose	4.65	4.67	4.67	0.007	0.06	0.52
Total solids	12.12	12.24	12.27	0.026	<0.01	0.54
Milk fatty acids						
g/100 g of milk						
Preformed ⁶	1.125	1.161	1.147	0.0120	0.05	0.42
Mixed ⁷	1.054	1.076	1.079	0.0090	0.03	0.83
De novo ⁸	0.718	0.749	0.732	0.0095	0.05	0.22
g/d						
Preformed	362.7	379.1	375.0	4.29	<0.01	0.51
Mixed	341.6	352.3	354.3	3.50	<0.01	0.70
De novo	232.4	244.9	241.1	3.40	0.01	0.43
g/100 g fatty acids						
Preformed	38.72	38.64	38.38	0.311	0.41	0.57
Mixed	36.50	36.10	36.66	0.294	0.53	0.19
De novo	24.78	25.26	24.96	0.422	0.68	0.61
MUN, mg/dL	16.29	16.61	16.60	0.198	0.21	0.98
SCC, ⁹ 0 to 9	1.80	1.78	1.85	0.151	0.32	0.54
Milk/DMI	1.46	1.45	1.43	0.015	0.21	0.41
ECM/DMI	1.39	1.40	1.39	0.016	0.90	0.60
BW, kg	610	618	618	1.5	<0.01	0.85
BCS, 1 to 5	3.13	3.14	3.13	0.029	0.85	0.84
First meal duration, min	57	54	55	1.6	0.25	0.55
Rum, ¹⁰ min/d	471	493	485	5.4	<0.01	0.34
Rum/DMI, min/kg	21.3	21.3	20.8	0.50	0.75	0.49
Rum/Rumen pH, ¹¹ min	72.8	75.3	72.3	1.28	0.56	0.10

¹ DMI, milk yield and rumination = Days 23 to 35. Milk components = Days 25 to 35. BW = Days 26 to 35. BCS = Day 35. First meal duration = Days 26 to 35. Milk fatty acids = Days 25 to 35

² CTL = Control. PHY = Digestarom. YOM = Digestarom, organic minerals and yeast

³ Standard error of the means

⁴ $P < 0.01$ for day (except rumination $P = 0.62$) and $P \geq 0.20$ for the interaction of treatment and day.

⁵ Energy-corrected milk

⁶ Preformed = Fatty acids ≥ 18 C

⁷ Mixed = Fatty acids with 16 or 17 C

⁸ De novo = Fatty acids with 4 to 15 C

⁹ Equivalency of the linear SCC: 1.80 = 43.600 cells/mL, 1.78 = 43.000 cells/mL, 1.85 = 45.100 cells/mL

¹⁰ Rumination time: Neck sensor (CowMed)

¹¹ Rumination time per unit of mean ruminal pH

Table 3. Ruminal volatile fatty acids (VFA) molar proportions, protozoa concentration, microbial yield and pH¹.

	Treatment ²			SEM ³	P-value ⁴	
	CTL	PHY	YOM		CTL vs PHY+YOM	PHY vs YOM
% of total VFA						
Acetate	60.46	60.77	60.91	0.263	0.25	0.71
Propionate	22.57	22.11	22.09	0.434	0.39	0.97
Butyrate	11.53	11.66	11.61	0.164	0.61	0.83
Isobutyrate	1.052	1.076	1.064	0.0119	0.21	0.49
Valerate	1.897	1.859	1.884	0.0515	0.68	0.74
Isovalerate	2.487	2.522	2.442	0.0531	0.93	0.30
Acetate/Propionate	2.823	2.848	2.849	0.0452	0.65	0.99
Protozoa, × 10 ⁵ /mL						
Alla, ⁵ mmol/d	388	387	437	40.9	0.51	0.23
Alla/DOMI, ⁶ mmol/kg	24.5	24.6	25.2	1.85	0.85	0.81
Mean pH						
Minimum pH	6.638	6.639	6.661	0.0312	0.75	0.61
Maximum pH	6.194	6.245	6.238	0.0538	0.49	0.92
pH range	7.088	7.040	7.073	0.0266	0.35	0.36
pH ≤ 6.2, min/d	0.893	0.794	0.835	0.0485	0.20	0.53
pH ≤ 5.8, min/d	72	51	49	23.3	0.44	0.96
	14	3	9	8.3	0.42	0.63

¹ Ruminal fluid samples were obtained on days 28 (before slug-feeding) and 33 (during slug-feeding). Reticular pH measured with Moonsyst probes on d 23 to 34. Microbial yield = Days 26 to 28 (1 value/cow/period)

² CTL = Control. PHY = Digestarom. YOM = Digestarom, organic minerals and yeast

³ Standard error of the means

⁴ $P < 0.01$ for day (except protozoa $P = 0.31$ and $\text{pH} \leq 5.8$ $P = 0.53$) and $P \geq 0.13$ for the interaction of treatment and day (except pH range $P = 0.04$ and Maximum pH $P = 0.02$)

⁵ Equivalency of urinary allantoin (mmol/d): 388 mmol/d = 305 g/d of microbial N; 387 mmol/d = 304 g/d of microbial N; 437 mmol/d = 342 g/d of microbial N. Duodenal purine base flow (mmol/d) = $17.0 + 1.037 \times \text{urinary allantoin}$ (Firkins et al., 2006). Microbial N (g/d) = (Duodenal purine base flow × 70) / (0.116 × 0.83 × 1000) (Chen and Gomes, 1992)

⁶ Allantoin/Digestible organic matter intake

Table 4. Jugular blood acid-base balance 8 h post-feeding during the two days of slug-feeding¹.

	Treatment ²			SEM ³	P-value ⁴	
	CTL	PHY	YOM		CTL vs PHY+YOM	PHY vs YOM
pH	7.458	7.459	7.446	0.0037	0.27	0.02
pCO ₂ , ⁵ mm Hg	33.13	34.77	36.23	0.8286	0.03	0.22
pO ₂ , ⁶ mm Hg	24.97	32.27	27.70	2.630	0.13	0.23
HCO ₃ ⁻ , mmol/L	24.03	24.30	24.70	0.266	0.16	0.30
Total CO ₂ , mmol/L	25.10	25.47	25.73	0.239	0.10	0.44
SatO ₂ , ⁷ %	48.10	55.87	48.60	2.347	0.16	0.04
Base excess, mmol/L	1.17	1.47	1.27	0.232	0.49	0.55

¹ Days 30 and 33² CTL = Control. PHY = Digestarom. YOM = Digestarom, organic minerals and yeast³ Standard error of the means⁴ $P \leq 0.02$ for day (except pCO₂ $P = 0.50$ and pO₂ $P = 0.06$) and $P \geq 0.11$ for the interaction of treatment and day⁵ Partial pressure of CO₂⁶ Partial pressure of O₂⁷ % oxygen saturation of hemoglobin

Table 5. Total-tract apparent digestibility, digestible OM intake (DOMI), energy corrected milk (ECM) over DOMI, fecal pH and viscosity, and gut permeability¹

	Treatment ²			SEM ³	P-value	
	CTL	PHY	YOM		CTL vs PHY+YOM	PHY vs YOM
Digestibility, % of intake						
DM	69.24	68.48	70.66	0.838	0.75	0.08
OM	71.29	70.46	72.43	0.770	0.87	0.09
NDF	40.17	39.16	42.31	1.895	0.81	0.24
Starch	98.39	98.20	98.32	0.078	0.19	0.27
Non NDF-starch OM	74.39	72.83	76.86	1.081	0.74	0.01
DOMI, kg/d	15.5	15.9	16.6	0.25	0.04	0.06
ECM/DOMI	2.07	2.11	2.00	0.031	0.63	0.03
Fecal pH	7.746	7.452	7.704	0.1518	0.37	0.25
Fecal viscosity, cP	17.85	17.67	16.17	1.229	0.54	0.40
Plasma Cr						
1,4,8,12,24 h, ⁴ µg/L	128.0	118.4	128.5	7.34	0.61	0.34
Area, µg/L × h	2753	2603	2813	149.6	0.81	0.34
LBP, ⁵ µg/mL	5.35	5.64	5.59	0.539	0.69	0.95

¹ Digestibility = Days 26 to 28. Fecal pH = Day 29. Fecal viscosity = Day 28. Gut permeability = Day 35. 1 value/cow/period. LBP = Days 29 and 35.

² CTL = Control. PHY = Digestarom. YOM = Digestarom, organic minerals and yeast

³ Standard error of the means

⁴ Hours post-infusion: $P < 0.01$ for hour and $P = 0.96$ for the interaction between treatment and hour

⁵ LPS-binding protein: $P = 0.02$ for day and $P = 0.94$ for the interaction between treatment and day. Means: 4.99 µg/mL on day 29 and 6.06 µg/mL on day 35

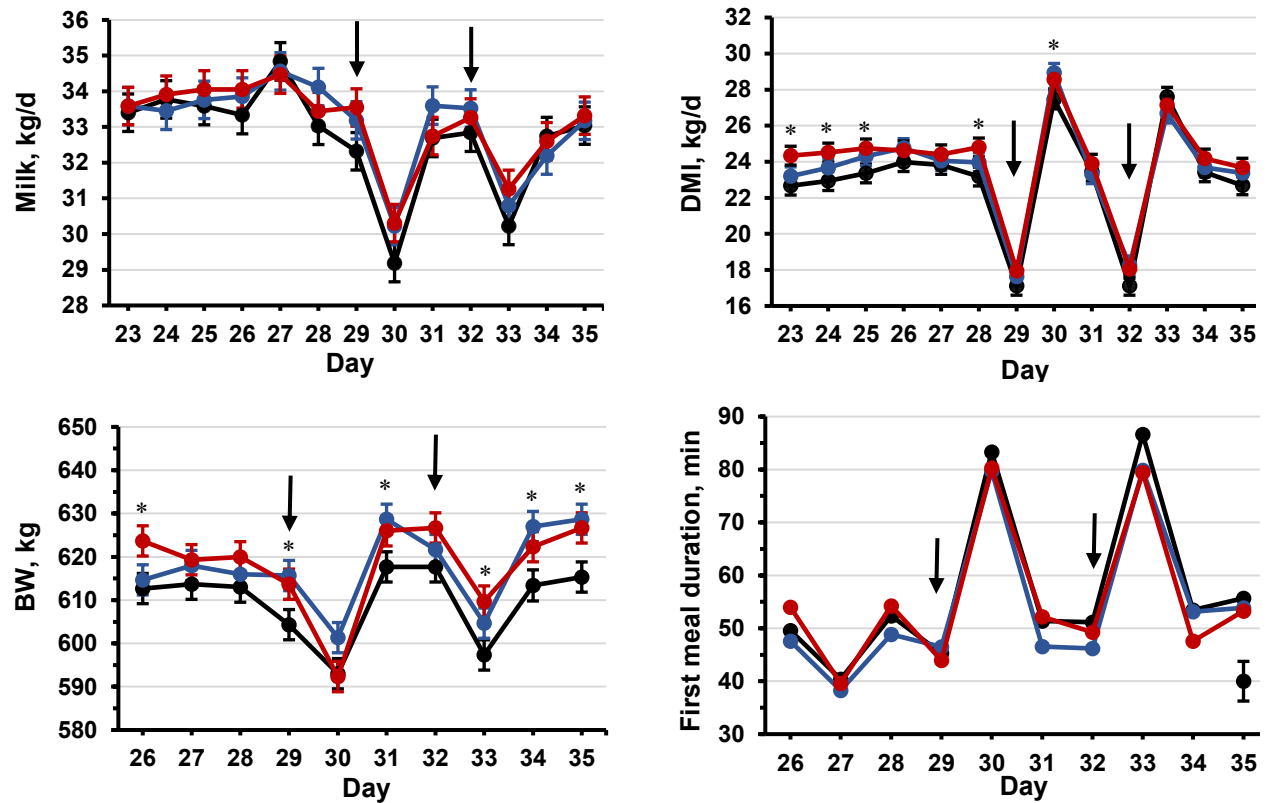


Figure 1. Milk yield (Milk), dry matter intake (DMI), body weight (BW) and first meal duration on treatments CTL (●), PHY (●) and YOM (●). Arrows indicate feed restriction (Days 29 and 32). *Slice option of SAS ($P < 0.05$).

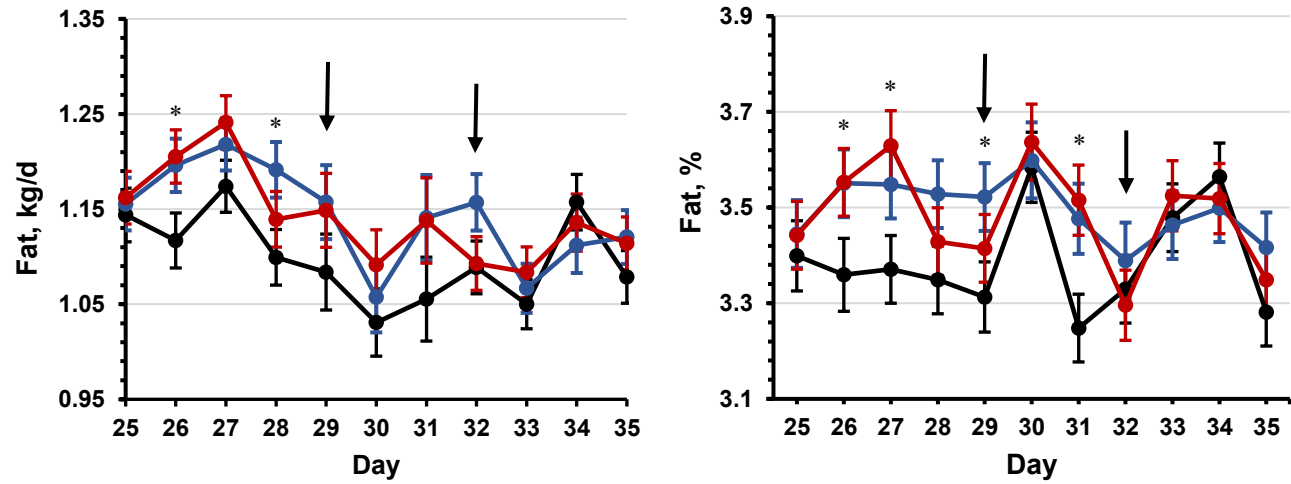


Figure 2. Milk fat yield and concentration on treatments CTL (●), PHY (●) and YOM (●). Arrows indicate feed restriction (Days 29 and 32). *Slice option of SAS ($P < 0.05$).

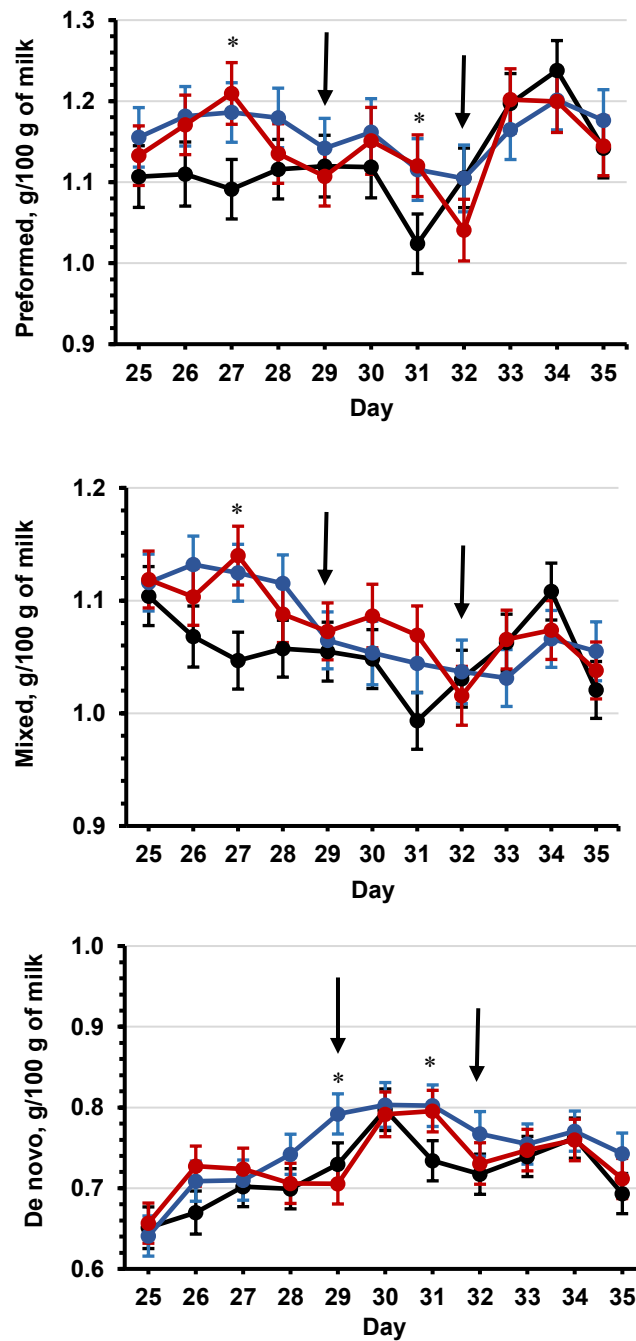


Figure 3: Milk fatty acids on treatments CTL (●), PHY (●) and YOM (●). Arrows indicate feed restriction (Days 29 and 32). *Slice option of SAS ($P < 0.05$).

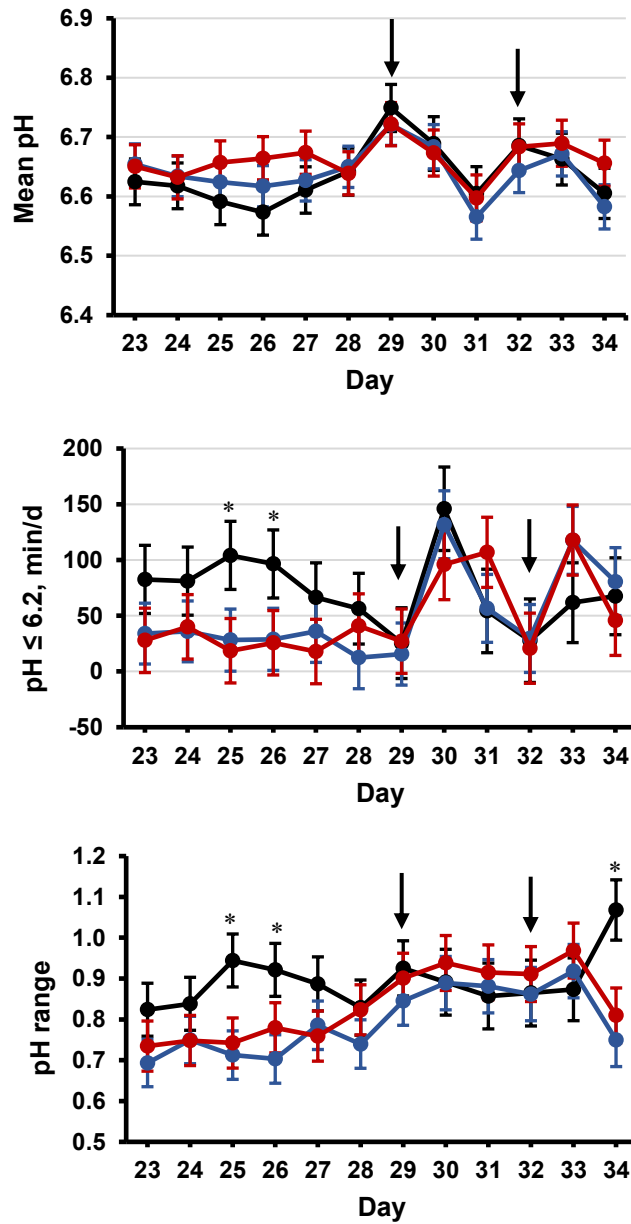


Figure 4. Mean ruminal pH, duration of pH ≤ 6.2 and pH range on treatments CTL (●), PHY (●) and YOM (●). Arrows indicate feed restriction (Days 29 and 32). Reticular pH measured with Moonsyst probes. *Slice option of SAS ($P < 0.05$).

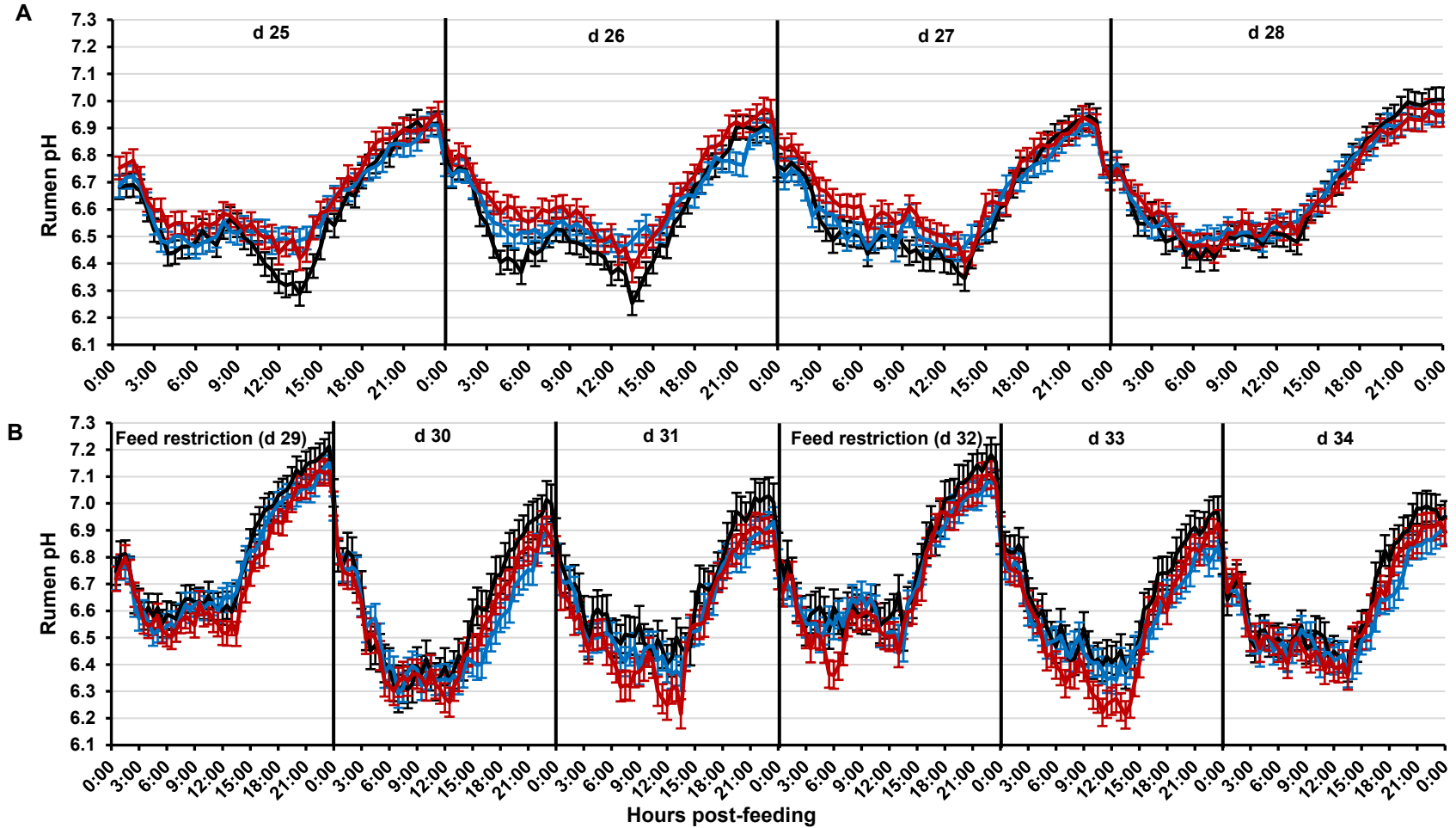


Figure 5. A) Rumen pH at 30-min intervals before the induction of ruminal acidosis. B) Rumen pH at 30-min intervals during the induction of ruminal acidosis. Treatments: CTL (●), PHY (●) and YOM (●). Reticular pH measured with Moonsyst probes.

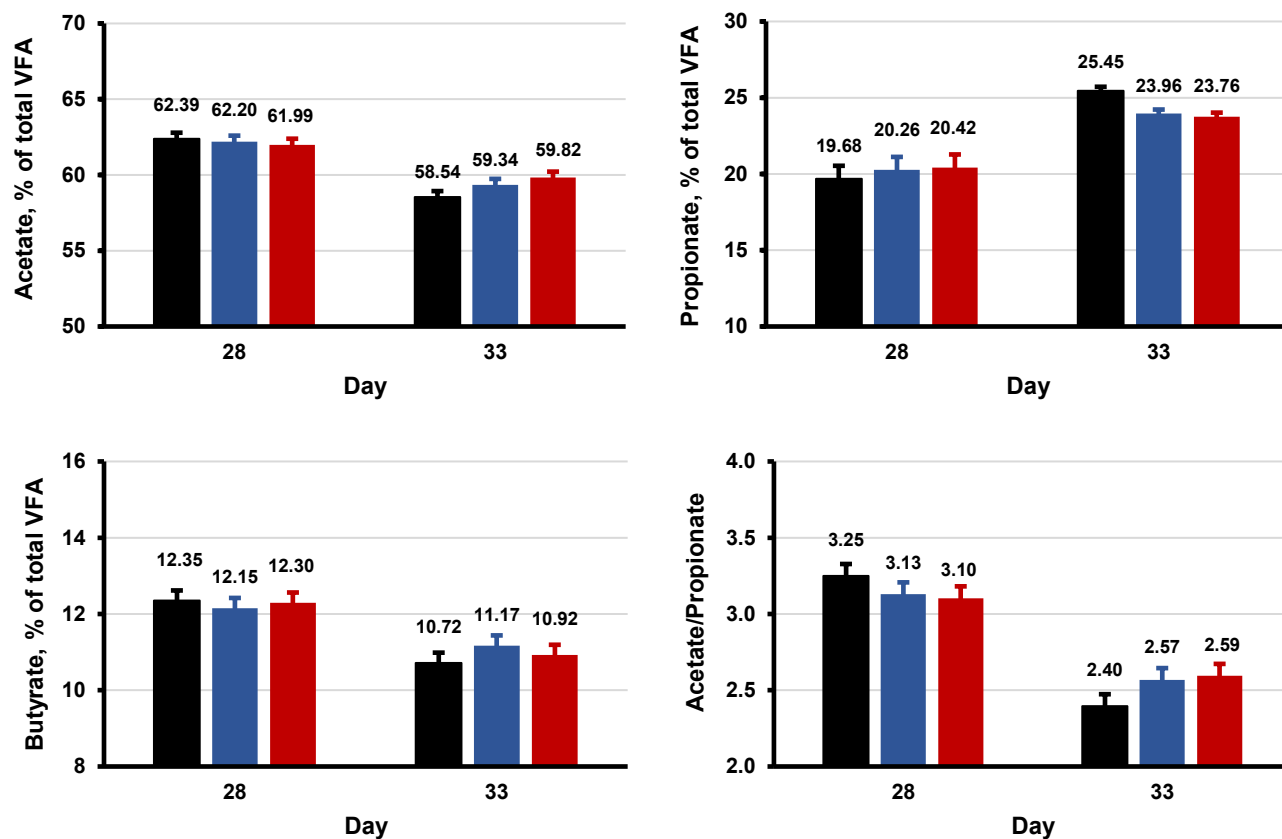


Figure 6. Molar proportions of ruminal volatile fatty acids (VFA) before (d 28) and during (d 33) the induction of ruminal acidosis on treatments CTL (●), PHY (●) and YOM (●). $P < 0.01$ for day.

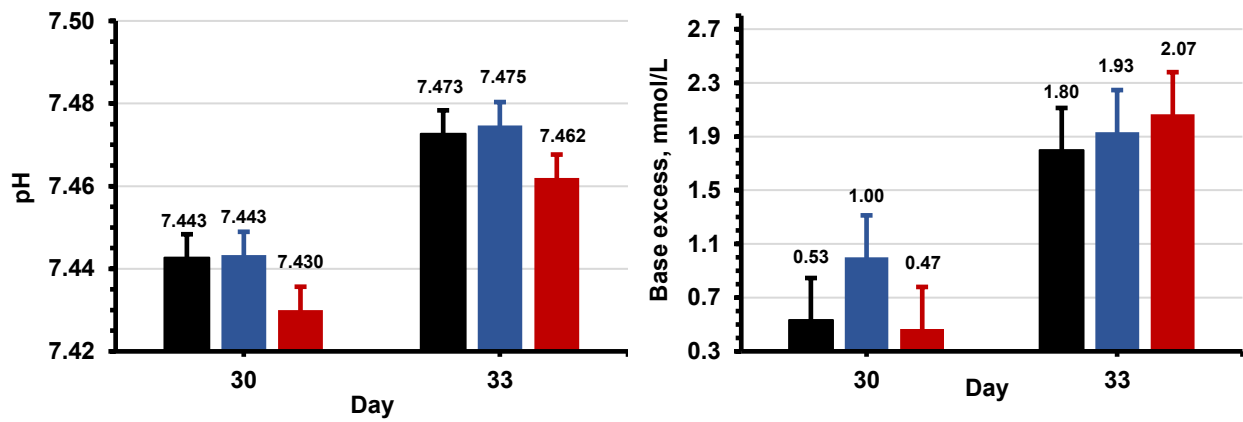


Figure 7. Jugular blood pH and base excess during the two days of slug-feeding (Days 30 and 33) on treatments CTL (●), PHY (●) and YOM (●). $P < 0.01$ for day

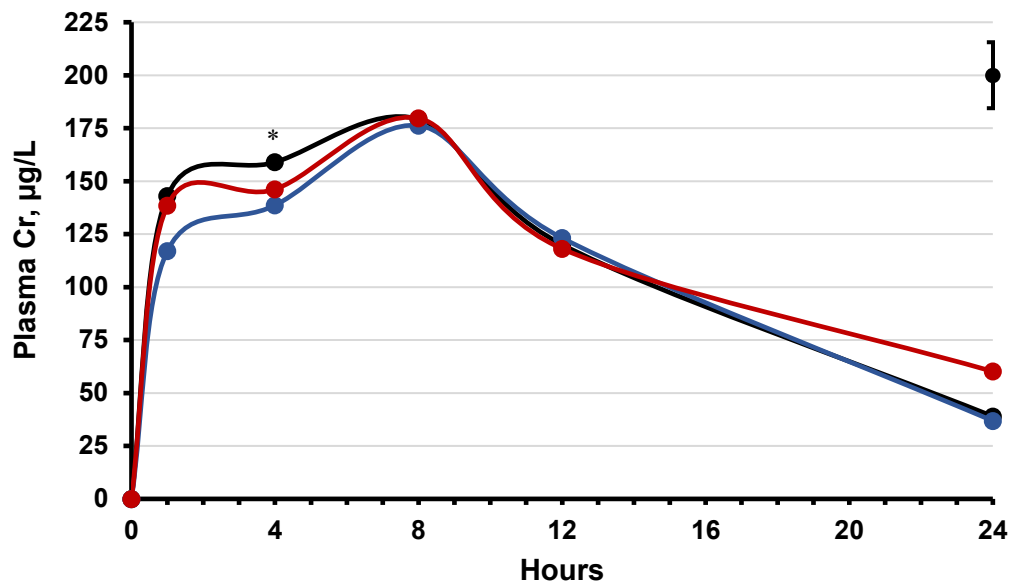
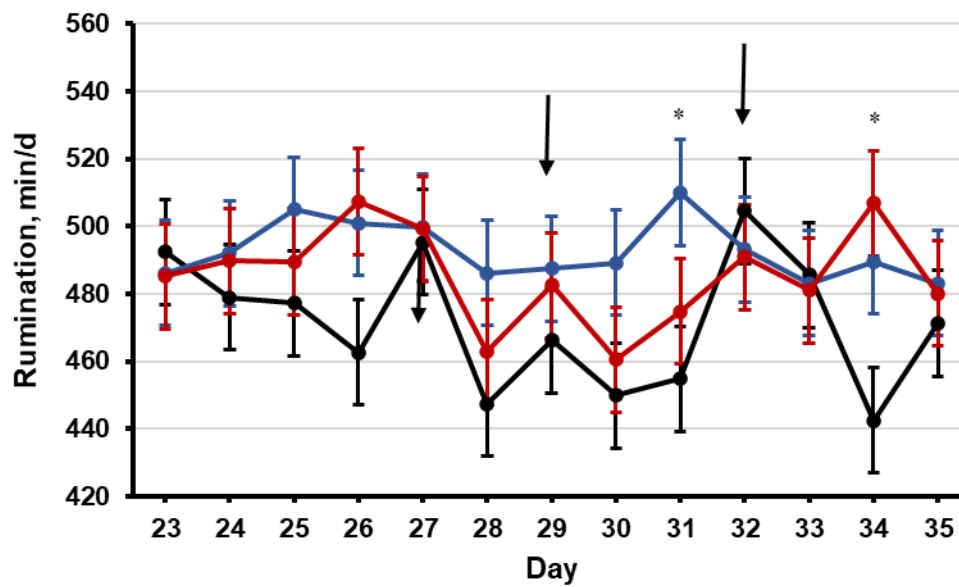


Figure 8. Plasma Cr concentration after pulse dosing Cr-EDTA into the rumen on treatments CTL (●), PHY (●) and YOM (●). *Slice option of SAS ($P < 0.05$).

Complementary figure:



Rumination time on treatments CTL (●), PHY (●) and YOM (●). Arrows indicate feed restriction (Days 29 and 32). Rumination measured with neck sensors (CowMed). *Slice option of SAS ($P < 0.05$).