

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFETIVIDADE FÍSICA DE FRAÇÕES DA SILAGEM DE  
MILHO ESTRATIFICADAS COM O SEPARADOR DE  
PARTÍCULAS DA PENN STATE PARA VACAS EM  
LACTAÇÃO

Autor: Francisco Antonio Piran Filho  
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel  
Coorientador: Prof. Dr. Clóves Cabreira Jobim

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Abril - 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFETIVIDADE FÍSICA DE FRAÇÕES DA SILAGEM DE  
MILHO ESTRATIFICADAS COM O SEPARADOR DE  
PARTÍCULAS DA PENN STATE PARA VACAS EM  
LACTAÇÃO

Autor: Francisco Antonio Piran Filho  
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel  
Coorientador: Prof. Dr. Clóves Cabreira Jobim

Tese apresentada, como parte  
das exigências para obtenção do  
título de DOUTOR EM  
ZOOTECNIA, no Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia da  
Universidade Estadual de  
Maringá – Área de Concentração  
Produção Animal

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Abril - 2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

P667e Piran Filho, Francisco Antonio  
Efetividade física de frações da silagem de milho estratificadas com o separador de partículas da Penn State para vacas em lactação / Francisco Antonio Piran Filho. -- Maringá, PR, 2022.  
xix, 127 f.: il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel.  
Coorientador: Prof. Dr. Clóves Cabreira Jobim.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2022.

1. Silagem de milho. 2. Fibra em detergente neutro (FDN). 3. Nutrição animal - Vacas leiteiras. 4. Bioensaios. I. Daniel, João Luiz Pratti, orient. II. Jobim, Clóves Cabreira, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.2085



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFETIVIDADE FÍSICA DE FRAÇÕES DA SILAGEM DE  
MILHO ESTRATIFICADAS COM O SEPARADOR DE  
PARTÍCULAS DA PENN STATE PARA VACAS EM  
LACTAÇÃO

Autor: Francisco Antonio Piran Filho  
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

TITULAÇÃO:

Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção Animal  
APROVADO em 29 de abril de 2022.

Prof. Dr. Luiz Felipe Ferrareto

Prof. Dr. Luiz Gustavo Nussio

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira

Prof. Dr. Rodrigo de Almeida

Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel  
Orientador

Ao meus pais, Angelita e Francisco por todo apoio, não apenas durante essa etapa, mas durante toda a minha vida. Seus ensinamentos sempre serão úteis em minha vida.

Às minhas irmãs Fernanda, Francieli e Francelise, pelo companheirismo e apoio durante toda a minha vida.

À minha esposa Camila pela compreensão, companheirismo, incentivo, paciência e amor. Você foi e continuará sendo muito importante na minha vida.

Aos meus cunhados Genilson, Mateus, Juliano e Diogo.

À minha sobrinha Sofia.

Aos meus sogros Valéria e Benedito.

Aos meus avós de sangue Osmar, Edir, Forindo (*in memoriam*) e Lúcia, e aos avós de consideração Milton e Aparecida.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida.

À Universidade Estadual de Maringá.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel pela dedicação, competência, paciência, companheirismo, ensinamentos e conselhos.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Clóves Cabreira Jobim.

Ao Departamento de Zootecnia da UEM.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UEM.

Aos colegas e amigos do grupo GESF: Alana, Andresa, Antônio, Ariane, Beatriz, Camila, Carolina, Danieli, Janaina, Júlia, Matheus, Miqueli, Nailah, Pâmela, Regina, Sara, Sérgio, Sillas, Vanessa Pereira, Vanessa Bolonhesi, Vinicius, que fizeram parte do grupo em algum momento durante a execução do experimento, muito obrigado pela ajuda, companheirismo e risadas compartilhadas.

Aos funcionários da FEI, Célio, Valdecir (Du), Nelson, Zé Carlos, Airton, Walter, Valdir, Wilson, Vilmar e Toninho, muito obrigado.

A todos os colegas de pós-graduação, em especial ao Jesús Alberto Cardozo Osório e Micheli Regiani Sippert pelo auxílio durante as análises laboratoriais.

Aos funcionários do laboratório de nutrição animal (LANA), Augusto, Osvaldo e Ulisses, pelo auxílio na realização das análises.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

FRANCISCO ANTONIO PIRAN FILHO, filho de Francisco Antonio Piran e Angelita Aparecida Pergher Piran, nasceu em Chopinzinho, Paraná, no dia 17 de março de 1991.

Em 2014, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Em 2016, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Em 2019, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de nutrição de ruminantes.

No dia 29 de abril de 2022, submeteu-se à banca para defesa da Tese.



## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES.....	xi
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xii
ABBREVIATIONS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISO DE LITERATURA.....	3
1. Estratificação bifásica da digesta ruminal.....	4
1.1 Importância.....	4
1.2. pH ruminal, motilidade ruminal, mastigação e produção de saliva.....	5
1.3. Fatores que interferem na formação do <i>mat</i> ruminal.....	6
2. Mecanismos de tamponamento da digesta ruminal.....	7
2.1 Remoção de AGV por absorção ruminal.....	8
2.1.1. <i>Transporte de AGV não dissociado por meio de difuso passiva</i> .....	8
2.1.2. <i>Transporte de AGV dependente de bicarbonato</i> .....	9
2.1.3. <i>Transporte de AGV independente de bicarbonato</i> .....	9
2.1.4. <i>Fatores que influenciam na absorção de AGV</i> .....	10
2.2. Remoção de AGV por passagem.....	11
2.2.1. <i>Transporte de AGV na mucosa omasal</i> .....	12
2.3. Importância da saliva.....	13
3. Acidose ruminal.....	14
3.1. Acidose ruminal subaguda.....	15
3.2. Acidose ruminal aguda.....	16
3.3. Fatores predisponentes  acidose subaguda.....	17
4. Tamanho de partículas da silagem de milho.....	18
5. Efeitos ruminais e metabólicos da ARSA.....	20
5.1 Comprometimento da função de barreira do epitelio do proventrículo.....	25
6. Controle da acidose ruminal.....	30
7. Exigências de fibra para vacas leiteiras.....	33
7.1. Recomendações com base no teor de FDN.....	34
7.2. Recomendações com base no teor de FDN de forragem (FDNF).....	35
7.3. FDN efetiva (FDNe).....	35
7.4. FDN fisicamente efetiva (FDNfe).....	36

7.5. FDN fisicamente ajustada (FDNfa).....	38
7.6. FDN indigestível fisicamente efetiva (FDNife).....	39
8. Métodos de avaliação do fator de efetividade de fibra.....	42
8.1. Métodos laboratoriais.....	42
8.1.1. <i>Ro-Tap com peneira de 1,18 mm</i> .....	42
8.1.2. <i>Separador de partículas ASABE</i> .....	43
8.1.3. <i>Separador de partículas da Penn State (PSPS)</i> .....	44
8.1.3.1. <i>Modelo com as peneiras de 19 mm, 8 mm e fundo</i> .....	44
8.1.3.2. <i>Modelo com as peneiras de 19 mm, 8 mm, 1,18 mm e fundo</i> .....	45
8.1.3.3. <i>Modelo com as peneiras de 19 mm, 8 mm, 4 mm e fundo</i> .....	45
8.1.4. <i>Análise por imagem</i> .....	46
8.2. Métodos biológicos para determinar a efetividade da fibra.....	46
8.2.1. <i>Bioensaio com controle negativo e controle positivo</i> .....	46
8.2.2. <i>Bioensaio sem controle negativo</i> .....	49
9. Integração do bioensaio e o separador de partículas PSPS.....	51
REFERÊNCIAS.....	51
III. OBJETIVO GERAL.....	74
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	74
IV. Physical effectiveness of corn silage fractions stratified with the Penn State particle separator for lactating dairy cows.....	75
INTRODUCTION.....	76
MATERIAL AND METHODS.....	77
<i>Animals and Treatments</i> .....	77
<i>Data collection and sampling</i> .....	78
<i>Laboratory analysis</i> .....	81
<i>Pef calculation</i> .....	83
<i>Statistical analysis</i> .....	83
RESULTS AND DISCUSSION.....	83
<i>Milk yield and composition</i> .....	84
<i>Nutrient intake, chewing behavior, and meal behavior</i> .....	85
<i>Particle sorting index</i> .....	86
<i>Particle size of swallowed bolus and rumen digesta</i> .....	87
<i>Characteristics of rumen digesta</i> .....	88
<i>Ruminal fermentation pattern</i> .....	89
<i>Total-tract digestibility and fecal traits</i> .....	90
<i>Urinary purine derivatives</i> .....	91
<i>Blood metabolites</i> .....	92
<i>Physical effectiveness factors (pef)</i> .....	92
CONCLUSIONS.....	93
ACKNOWLEDGMENTS.....	93
REFERENCES.....	94
TABLES.....	101
FIGURES.....	113
SUPPLEMENTAL FIGURES.....	114
V. INTERPRETAÇÃO E RECOMENDAÇÕES.....	117

## LISTA DE TABELAS

### II. REVISÃO DE LITERATURA

<b>Tabela 1.</b> Fluxo de bicarbonato no rúmen de bovinos.....	9
<b>Tabela 2.</b> Concentrações de D-lactato no sangue de ruminantes.....	24
<b>Tabela 3.</b> Recomendações de retenção mínima de MS dietética na peneira de 8 mm do PSPS conforme retenção de MS na peneira de 19 mm para manter pH ruminal médio $\geq 6$ em vacas em lactação alimentadas com RTM.....	32
<b>Tabela 4.</b> Consumo de matéria seca e fibra para vacas alimentadas com diferenças dietéticas em FDNi e FDNfe.....	40
<b>Tabela 5.</b> Comparativo de fatores de efetividade com base na gordura do leite, ruminação e mastigação total.....	50

### IV. PHYSICAL EFFECTIVENESS OF CORN SILAGE FRACTIONS STRATIFIED WITH THE PENN STATE PARTICLE SEPARATOR FOR LACTATING DAIRY COWS

<b>Table 1.</b> Composition of diet ingredients.....	101
<b>Table 2.</b> Composition of the experimental diets.....	102
<b>Table 3.</b> Particle size distribution, and NDF distribution of the experimental diets.....	103
<b>Table 4.</b> Milk yield and composition.....	104
<b>Table 5.</b> Nutrient intake and feeding behavior.....	105
<b>Table 6.</b> Particle sorting index (PSI).....	106

<b>Table 7.</b> Dry sieving of swallowed bolus and rumen digesta evacuated 1-h before morning feeding and 8-h after morning feeding.....	107
<b>Table 8.</b> Characteristics of rumen digesta.....	108
<b>Table 9.</b> Ruminal fermentation pattern.....	109
<b>Table 10.</b> Total-tract digestibility and fecal traits.....	110
<b>Table 11.</b> Urinary purine derivatives and blood metabolites.....	111
<b>Table 12.</b> Physical effectiveness factors (pef) based on animal responses for NDF stratified with the Penn State particle separator.....	112

## V. INTERPRETAÇÃO E RECOMENDAÇÕES

<b>Tabela 1.</b> Estudos sumarizados nesta revisão sobre a distribuição de partículas da silagem de milho colhida com diferentes tamanhos teóricos de corte.....	118
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros das regressões segmentadas.....	119
<b>Tabela 3.</b> Estudos sumarizados nesta revisão sobre os efeitos das razões entre FDN fisicamente efetivo e amido degradável no rúmen sobre as respostas de vacas leiteiras.....	124
<b>Tabela 4.</b> Respostas de vacas leiteiras consumindo dietas com silagem de milho como única fonte de forragem, com FDNfe variando com alterações no tamanho de partícula da silagem de milho.....	126

## LISTA DE FIGURAS

## IV. PHYSICAL EFFECTIVENESS OF CORN SILAGE FRACTIONS STRATIFIED WITH THE PENN STATE PARTICLE SEPARATOR FOR LACTATING DAIRY COWS

**Figure 1.** Lactate concentration in rumen fluid.....113

## V. INTERPRETAÇÃO E RECOMENDAÇÕES

**Figura 1.** Relação entre tamanho teórico de corte (mm) e porcentagem de partículas retidas nas peneiras de 19 mm (A), 8 mm (B) e fundo (C) do PSPS.....120

**Figura 2.** Relação entre tamanho teórico de corte (mm),  $fef_{>8mm}$  (A; calculado de acordo com Zebeli et al., 2012) e  $fef_{bio}$  (B; calculado como apresentado no início desse tópico).....121

**Figura 3.** Relações entre as razões  $FDN_{fe>8mm}$ : AmidoDR,  $FDN_{febio}$ : AmidoDR e  $FDN_{febio}$ : AmidoDR e o pH ruminal (1 e 2), o tempo de mastigação (3 e 4), o teor de gordura do leite (5 e 6), o CMS (7 e 8) e a produção de leite (9 e 10).....127

## LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES

<b>Supplemental figure S1.</b> Relative frequency of particles retained in pan.....	114
<b>Supplemental figure S2.</b> Relative frequency of particles retained in the 8 mm sieve. .....	115
<b>Supplemental figure S3.</b> Relative frequency of particles retained in the 19 mm sieve. .....	116

## LISTA DE ABREVIACÕES

- AG – ácidos graxos
- AmidoDR – Amido degradável no rúmen
- AGV - Ácidos graxos voláteis
- AGV<sup>-</sup> - Ácidos graxos voláteis dissociados
- AGVH - Ácidos graxos voláteis não dissociados
- ARSA – Acidose ruminal subaguda
- BEN – Balanço energético negativo
- CCC - Coeficiente de correlação de concordância
- CMS – Consumo de matéria seca
- CNF – Carboidratos não fibrosos
- CP - Controle positivo
- DEL - Dias em lactação
- ED – Energia digestível
- FB – Fibra bruta
- FDA – Fibra em detergente ácido
- FDN - Fibra em detergente neutro
- FDNf – FDN de forragem
- FDNfa - FDN fisicamente ajustada
- FDNfe – FDN fisicamente efetiva
- FDNi – FDN indigestível
- FDNife240 - FDN indigestível (240h) fisicamente efetivo
- fef – Fator de efetividade física
- FFNF - Fontes de fibra não forragem

FGM - Farelo de glúten de milho  
Hp - Haptoglobina  
Ka - Constante de dissociação do ácido  
ka - Taxa fracional de absorção  
kc – Taxa fracional de clearance  
kd - Taxa fracional de degradação  
kp – Taxa fracional de passagem  
FDN<sub>fe>8mm</sub> – FDN fisicamente efetiva com base nas peneiras de 8 e 19 mm  
FDN<sub>febio</sub> – FDN fisicamente efetiva com base nos resultados do ensaio biológico  
fef – Fator de efetividade física  
fef<sub>bio</sub> – Fator de efetividade física com base nos resultados do ensaio biológico  
LBP - Proteína de ligação a LPS  
LCE - Produção de leite corrigido para energia  
LPS - Lipopolissacarídeo  
MCT1 - Transportador monocarboxilato 1  
MO - Matéria orgânica  
MS - Matéria seca  
PSPS – Separador de partículas Penn State  
PB - Proteína bruta  
PC – Peso corporal  
RTM - Ração total misturada  
SAA - Soro amilóide A  
SGLT1 - Transportador de glicose dependente de sódio  
SM – Silagem de milho  
SPIM - Silagem de planta inteira de milho  
PSPS – Separador de partículas Penn State  
TTC - Tamanho teórico de corte  
TCO<sub>2</sub> - CO<sub>2</sub> total  
uCCC - Coeficiente de correlação de concordância não corrigido  
UE - Unidades de endotoxina



## ABBREVIATIONS

ADF - Acid detergent fiber  
ADL - Acid detergent lignin  
APB - acetate + propionate + butyrate  
BCS – Body condition score  
BW - Body weight  
CG - Corn grain  
CON - Control  
CP – Crude protein  
CS – Whole-plant corn silage  
CSPS - Corn silage processing score  
dDMI - Intake of digestible DM.  
DE - Digestible energy  
DIM - Days in milk  
DM - Dry matter  
DMI - Dry matter intake  
ECM - Energy-corrected milk  
EE - Ether extract  
EU - Endotoxin units  
FA - Fatty acids  
FCM - Fat-corrected milk  
FS - Fiber source  
fNDF - forage NDF  
GMPS - Geometric mean particle size

GSD - Geometric standard deviation  
ka - Fractional absorption rate  
kc - Fractional clearance rate  
kp - Fractional passage rate  
LPS - Lipopolysaccharide  
MUN - Milk urea nitrogen  
NEFA - Non-esterified fatty acids  
NE<sub>L</sub> – Net energy for lactation  
NDF - Neutral detergent fiber  
NFC - Non-fiber carbohydrates  
OM – Organic matter  
pef – Physical effectiveness factor  
peNDF - Physically effective fiber  
PSPS - Penn State Particle Separator  
PSI - Particle sorting index  
PUN - Plasma urea nitrogen  
RCGS - Reconstituted corn grain silage  
RDS - Rumen degraded starch  
SARA - Subacute ruminal acidosis  
SCC - Somatic cell count  
SD - Standard deviation  
SEM - Standard error of the mean  
SH - Soybean hulls.  
TMR – Total mixed ration  
uNDF - Undegraded neutral detergent fiber  
VFA - Volatile fatty acids

## RESUMO

A silagem de planta inteira de milho (SM) é a principal forragem conservada utilizada para vacas leiteiras. Na maioria das dietas para vacas em lactação, a SM é a principal fonte de fibra fisicamente efetiva (FDNfe). O separador de partículas da Penn State (PSPS) tem sido utilizado por nutricionistas como ferramenta para medir a estrutura física de forragens e rações completas, porém a efetividade física da fibra em detergente neutro (FDN) de cada fração estratificada pelo PSPS é desconhecida. O objetivo desse estudo foi examinar a efetividade física de partículas da SM estratificadas com o PSPS para vacas em lactação. Oito vacas Holandesas em lactação ( $27,6 \pm 2,77$  kg de leite;  $611 \pm 74$  kg peso corporal;  $152 \pm 83$  dias em lactação) foram alocadas em dois quadrados latinos balanceados  $4 \times 4$ . Quatro vacas canuladas no rúmen compuseram um quadrado latino (16 d de adaptação e 6 d de coletas) e quatro vacas intactas compuseram o outro. As partículas foram estratificadas usando três conjuntos PSPS (modelo de 2 peneiras e a bandeira fechada no fundo) e o material foi armazenado em tambores de 200 L por 60 d. As quatro dietas experimentais foram as seguintes: 1) **CON** (controle): 17% de FDN de forragem (FDNf) de SM; 2) **<8**: 17% de FDNf de SM + 9% de FDN de partículas de SM <8 mm; 3) **8-19**: 17% de FDNf de SM + 9% de FDN de partículas de SM de 8-19 mm; 4) **>19**: 17% de FDNf de SM + 9% de FDN de partículas de SM >19 mm. O restante da dieta continha silagem de grão reidratado de milho, milho moído seco, casquinha de soja, farelo de soja, bicarbonato de sódio, óxido de magnésio e mistura mineral-vitamínica. Os dados foram analisados com modelo incluindo efeito aleatório de vaca(quadrado) e efeitos fixos de quadrado, período e tratamento. Os dados de fermentação ruminal foram analisados como medidas repetidas no tempo. As médias de tratamentos foram comparadas por contrastes ortogonais: CON vs fonte de fibra (FF); CON vs <8 e 8-19 vs >19. A dieta CON diminuiu o consumo de matéria seca (MS), o tempo de mastigação

(min/d), o desaparecimento ruminal in situ (24 h) de MS e FDN da SM, o pH ruminal, a digestibilidade aparente no trato total, a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, o teor e a produção de gordura do leite e o teor de nitrogênio ureico do leite, porém, aumentou as concentrações de lactato no rúmen e lipopolissacarídeos (LPS) no plasma quando comparada às dietas contendo frações de SM. Assim, os animais que receberam a dieta CON estavam em acidose ruminal subaguda. A adição de SM na dieta, independentemente do tamanho de partículas, reduziu a acidose ruminal subaguda. Entre as frações de SM, menor tempo de ingestão + ruminação (659 vs 718 min/d), menor produção de gordura do leite (0,901 vs 0,962 kg/d) e maior concentração de LPS no plasma (0,173 vs 0,031 EU/mL) foram encontrados para o tratamento SM <8 mm em comparação com SM 8-19 mm. O fornecimento de SM 8-19 mm resultou em maior consumo de MS (22,4 vs 21,2 kg/d), tempo de mastigação (718 vs 657 min/d), AGV ruminal (104 vs 91,7 mM), produção de leite (26,8 vs 24,8 kg/d), produção de gordura (0,962 vs 0,889 kg/d) e produção de proteína (0,873 vs 0,798 kg/d) do que o tratamento SM >19 mm. As concentrações sanguíneas de D-lactato e soro amilóide A foram semelhantes entre as frações de SM. Não foram encontradas diferenças entre CON e frações da SM para pool e  $k_p$  de fluido ruminal,  $k_a$  e  $k_c$  de valerato, no entanto, houve tendência de menor eficiência relativa de síntese de proteína microbiana com base nos derivados de purinas na urina, quando comparadas às frações SM. A FDN de partículas de SM >19 mm foi menos efetiva do que a SM 8-19 mm, devido à seleção contra partículas >19 mm, FDN e FDN<sub>i</sub>, e a favor do amido, portanto, essa fração deve ser considerada com cautela ao estimar a FDN<sub>fe</sub> para vacas leiteiras em lactação.

**Palavras-chave:** bioensaio, tamanho de partícula, fator de efetividade física

## ABSTRACT

Corn silage (CS) is the main conserved forage used for dairy cows worldwide. In most dairy diets, CS is the primary source of physically effective fiber (peNDF). The Penn State particle separator (PSPS) has been used by nutritionists as a tool to measure the physical structure of forages and total mixed rations, but the physical effectiveness of neutral detergent fiber (NDF) of each fraction stratified by the PSPS is unknown. Therefore, the aim of this study was to examine the physical effectiveness of CS particles stratified with the PSPS for lactating cows. Eight lactating Holstein cows ( $27.6 \pm 2.77$  kg of milk;  $611 \pm 74$  kg body weight;  $152 \pm 83$  days in milk) were allocated in two  $4 \times 4$  balanced-Latin squares (16 d of adaptation and 6 d of collections). Four rumen cannulated cows composed one Latin square and four intact cows composed the other. The particles were stratified using PSPS devices (2-sieve model) and the material was stored in 200-L drums for 60 d. The four experimental diets were as follows: 1) **CON** (control): 17% forage NDF (fNDF) from whole-plant CS; 2) **<8**: 17% fNDF from whole-plant CS + 9% NDF from CS particles <8 mm; 3) **8-19**: 17% fNDF from whole-plant CS + 9% NDF from CS particles within 8-19 mm; 4) **>19**: 17% fNDF from whole-plant CS + 9% NDF from CS particles >19 mm. The remainder of the diet consisted of reconstituted corn grain silage, dry ground corn grain, soybean hulls, soybean meal, sodium bicarbonate, magnesium oxide, and mineral-vitamin mix. Data were analyzed with a model including a random effect of cow(square), and fixed effects of square, period, and treatment. Ruminal fermentation data were analyzed as repeated measures over time. Treatment means were compared by orthogonal contrasts: CON vs fiber source (FF); CON vs <8 and 8-19 vs >19. The NC diet decreased dry matter (DM) intake, chewing time, ruminal in situ disappearance (24 h) of DM and NDF of CS, ruminal pH, total-tract apparent digestibility, 3.5% fat-corrected milk, milk fat content and yield, and milk urea nitrogen,

whereas increased rumen lactate and plasma lipopolysaccharide (LPS) when compared with diets containing CS fractions. Hence, animals receiving NC were in subacute ruminal acidosis. The addition of CS to the diet, regardless of particle size, reduced subacute ruminal acidosis. Among CS fractions, shorter eating + rumination time (659 vs 718 min/d), lower milk fat yield (0.901 vs 0.962 kg/d), and higher plasma LPS concentration (0.173 vs 0.031 EU/mL) were found for CS <8 mm compared with CS with 8-19 mm. The CS with 8-19 mm led to greater DM intake (22.4 vs 21.2 kg/d), chewing time (718 vs 657 min/d), rumen VFA (104 vs 91.7 mM), milk (26.8 vs 24.8 kg/d), fat (0.962 vs 0.889 kg/d) and protein (0.873 vs 0.798 kg/d) yields than the CS >19 mm. Blood concentrations of D-lactate and serum amyloid A were similar among CS fractions. No differences were found between CON and CS fractions for rumen fluid kp and pool, valerate ka and kc, however, there was a trend towards lower relative efficiency of microbial protein synthesis based on urinary purine derivatives when compared to CS fractions. The NDF of CS >19 mm was less effective than CS 8-19 mm, due to the sorting behavior against particles >19 mm, NDF, and uNDF, and in favor of starch, therefore, this fraction should be considered with caution when estimating peNDF for dairy cows.

**Key words:** bioassay, particle size, physical effectiveness factor

## I. INTRODUÇÃO

Um dos desafios dos sistemas de nutrição de bovinos leiteiros modernos é conciliar a alta densidade energética da dieta necessária para suportar alto desempenho produtivo com proporções adequadas de fibra em detergente neutro (FDN) fisicamente efetiva (FDNfe), necessária para evitar desordens metabólicas (Zebeli et al., 2011). A inclusão de FDNfe na dieta de ruminantes é essencial para manutenção do funcionamento normofisiológico do trato digestório (Zebeli et al., 2012a).

A efetividade da FDN é definida como a capacidade total de um alimento para substituir forragem em uma ração, de modo que uma característica seja efetivamente mantida (Mertens, 1997). A efetividade da FDN pode ser dividida em dois componentes: o primeiro inclui a efetividade física da FDN em estimular a formação de *mat* ruminal, a motilidade ruminal e a mastigação, e, o segundo é o componente químico da FDN, o qual diminui a produção de ácidos no rúmen pela substituição de carboidratos não fibrosos (Armentano e Pereira, 1997).

A FDN de forragem, que não foi finamente processada, é o principal componente da FDNfe da dieta, apresentando relação positiva com o pH ruminal (Allen, 1997). A FDN de forragem é fisicamente mais efetiva do que a FDN de subprodutos fibrosos ou grãos (Swain e Armentano, 1994), pois esses alimentos apresentam menor tamanho de partículas e taxa de passagem semelhante ou superior ao das forragens (Batajoo e Shaver, 1994; Bhatti e Firkins, 1995), resultando em menor tempo de retenção ruminal e menor estímulo à mastigação (Grant, 1997).

A silagem de milho é a principal forragem conservada utilizada em rebanhos leiteiros no Brasil e no mundo. Na maioria das dietas, para vacas leiteiras confinadas, a silagem de milho é a fonte primária de FDNfe. Entretanto, a utilização de colhedoras de forragem com diferentes configurações de fabricação ou regulagem, resultam em silagens

de milho com ampla variação nas características físicas. O conjunto de peneiras da Penn State (PSPS) tem sido utilizado por nutricionistas de campo como ferramenta para adequar a estrutura física de dietas para vacas leiteiras, no entanto, não se conhece até o momento a efetividade física da FDN de cada fração estratificada pela PSPS.

Conhecer o fator de efetividade física das frações da silagem de milho estratificadas com o conjunto de peneiras PSPS deve possibilitar a formulação de dietas com precisão e reduzir os riscos de distúrbio metabólicos, como a acidose ruminal, e concomitantemente evitar inclusões excessivas de fibra efetiva capazes de limitar o consumo de MS (CMS) e o desempenho dos animais. Portanto, o objetivo do presente estudo é determinar a efetividade física da FDN de frações da silagem de milho segredadas com o conjunto de peneiras PSPS para vacas em lactação.

Nós hipotetizamos que a FDN de partículas >19 mm tem fef igual ou menor do que a FDN de partículas com 8-19 mm devido à cominuição das partículas antes da deglutição (Schadt et al., 2012) assim como maior risco de seleção contra partículas longas (McCarthy et al., 2018). Devido ao menor tamanho de partícula, também hipotetizamos que a FDN de partículas <8 mm pode ser menos efetiva do que a FDN de partículas com 8-19 mm.



## II. REVISÃO DE LITERATURA

Os ruminantes não produzem enzimas que degradam fibras, todavia, abrigam bactérias, fungos e protozoários que possuem essa capacidade (Van Soest, 1994). Assim, o hospedeiro fornece aos microrganismos um ambiente adequado para o crescimento (mistura constante, pH, umidade e temperatura estáveis) e os microrganismos sintetizam AGV, proteínas e vitaminas para o animal (Russell e Rychlik, 2001; Gordon e Phillips, 1998). A fermentação microbiana ocorre principalmente no ruminorretículo, sendo que 90% ou mais da digestão total da fibra ocorre nesse compartimento (Mertens e Grant, 2020).

Durante a ingestão e a ruminação, a cominuição das partículas pela mastigação é um passo importante no processo de digestão, pois a redução do tamanho de partícula é necessária para a passagem de resíduos não digeridos do proventrículo (Beauchemin, 2018), mas também é crucial para a ruptura da cutícula e aumenta o acesso para colonização microbiana (Mertens e Grant, 2020).

Um obstáculo para degradação da parede celular é a interação entre lignina, celulose, hemicelulose e outros compostos que limitam o acesso de enzimas ao substrato preso nessa matriz (Wang e McAllister, 2002). Outro fator limitante é o tempo de retenção no rúmen para a digestão dos tecidos vegetais, o qual sofre grande influência de tamanho e de densidade da partícula ingerida e da sua resistência a redução de tamanho (Wang e McAllister, 2002), bem como de interações com o animal e o nível de CMS (Grovmum et al., 1977; Colucci et al., 1990; Krizsan et al., 2010).

O conteúdo do rúmen é estratificado em fase líquida localizada na parte ventral, gás na parte dorsal, um conjunto de pequenas partículas dispersas na fase fluida e uma camada sólida flutuante sobre a fase líquida, que é composta principalmente de partículas grandes recém ingeridas (*mat* ruminal) (Welch, 1982; Poppi et al., 2001). As partículas de alimentos recém-ingерidas, por serem mais longas e menos densas, tendem a contribuir para a formação do *mat* ruminal (Beauchemin, 2018). Porém, essas fases nem sempre são bem distintas em vacas leiteiras alimentadas *ad libitum* com dietas contendo alta proporção de concentrados (Zebeli et al., 2012a). A formação do *mat* é altamente dependente da ingestão de fibra de forragem e partículas longas, que são fatores determinantes da FDNfe (Zebeli et al., 2012a).

## 1. Estratificação bifásica da digesta ruminal

### 1.1 Importância

O *mat* ruminal é um indicador do funcionamento adequado do rúmen em vacas leiteiras devido às suas duas principais funções: otimizar o ambiente ruminal, especialmente o pH, por estimulação física da ruminação, salivação e motilidade ruminal e promover a retenção de partículas, permitindo assim uma digestão mais eficiente (Poppi et al., 2001; Zebeli et al., 2012a). Quanto maior a consistência do *mat* ruminal, menor será a probabilidade de partículas do alimento escaparem sem degradação. Aumentar o escape de partículas potencialmente degradáveis do rúmen afeta negativamente a degradação ruminal e a utilização dos ingredientes da dieta (Weidner e Grant, 1994). A estratificação da digesta é a pré-condição mais importante para uma ótima digestão dos nutrientes no proventrículo, principalmente dos carboidratos fibrosos (Tafaj et al., 2004), pois a maioria das partículas apresentam tamanho menor do que o tamanho crítico para escape (Shaver et al., 1988).

Comparando a dinâmica ruminal de vacas alimentadas com silagem de alfafa ou de gramínea, Kammes e Allen (2012) observaram que mais de 55% das partículas no rúmen eram menores que 2,36 mm, indicando que o tamanho de partícula sozinho não é o fator limitante para a passagem. No trabalho realizado por Allen e Grant (2000), foi avaliado o efeito do tamanho das partículas da forragem sobre a consistência do *mat* ruminal e taxa de passagem do farelo de glúten de milho (FGM). A adição de feno picado grosseiramente (para aumentar FDN<sub>fe</sub>) diminuiu a taxa de passagem do FGM, que comparada a dieta sem feno adicional, aumentou a atividade de ruminação e a extensão da digestão da FDN. O aumento da consistência do *mat* ruminal resultou em uma redução de 34,4% na taxa de passagem de pequenas partículas e um aumento de 37,9% na digestão ruminal da FDN, o que foi associado a maior produção de leite (Allen e Grant, 2000). Foram utilizadas 4 vacas holandesas com canula ruminal, nas quais a taxa fracional foi estimada usando érbio como marcador e a consistência do *mat* foi mensurada de acordo com Welch (1982).

O *mat* ruminal não é apenas o local de fermentação da fibra, mas também de fermentação do concentrado (Storm e Kristensen, 2010), o que tem consequências para a composição química e microbiana do *mat* ruminal em vacas leiteiras alimentadas com dietas ricas em concentrado (Zebeli et al., 2012a). Em comparação a porção ventral, devido a maior concentração de substrato e microorganismos na digesta sólida (Tafaj et

al., 2004; Storm e Kristensen, 2010), são observadas, na porção mediana da digesta ruminal, a maior concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) e menor valor de pH.

### **1.2. pH ruminal, motilidade ruminal, mastigação e produção de saliva**

O *mat* ruminal também pode melhorar o tamponamento do conteúdo ruminal, aumentando o fluxo de saliva, a qual é rica em tampões, devido à estimulação mecânica da ruminação (Poppi et al., 2001; Tafaj et al., 2004). Desse modo, o *mat* ruminal contribui para neutralizar as quedas de pH ruminal e manter ambiente adequado para a microbiota e processos de síntese no rúmen (Tajima et al., 2000).

A baixa motilidade ruminal em dietas ricas em grãos pode ser atenuada com o uso de dietas que promovam a formação de *mat* ruminal consistente e denso (Allen, 1997; Zebeli et al., 2012a; Humer, et al., 2018). Contrações do ruminorretículo causam movimento contínuo da digesta, fazendo com que os AGV produzidos se aproximem do epitélio para serem absorvidos, homogeneizam o bicarbonato secretado pelo epitélio no conteúdo ruminal, ajudam a expulsar, por eructação, os gases gerados pela fermentação, ajudam a impulsionar o fluido ruminal e movem as partículas para que possam sair do compartimento (Beauchemin, 2018).

Os animais ruminantes tendem a ingerir partículas que podem ser retidas seletivamente no rúmen. Essas partículas maiores do que o tamanho crítico de escape são remastigadas durante a ruminação (Mertens e Grant, 2020). À medida que a digesta é ruminada, as partículas são cominuídas ainda mais, ocorrendo a hidratação do bolo com saliva, a liberação de gases aprisionados e a densidade das partículas aumentam. Assim, elas tendem a escaparem mais facilmente do rúmen (Welch, 1982; Beauchemin, 2018).

O tempo de mastigação (ingestão + ruminação) tem sido utilizado como medida de efetividade da FDN, pois afeta a secreção de saliva, o processo de cominuição das partículas de alimentos, a função ruminal, o CMS e a porcentagem de gordura no leite (Colenbrander et al., 1991). Alguns experimentos demonstraram que a atividade de mastigação é a característica que reflete as propriedades químicas e físicas do ingrediente, como o teor de FDN, o tamanho de partículas e a fragilidade do ingrediente (Balch, 1971; Sudweeds et al., 1981; Welch e Smith, 1970). Para vacas leiteiras de alta produção, o processo de mastigação desempenha papel fundamental na manutenção de altos níveis de CMS e da função digestiva. Na mastigação as partículas são reduzidas em tamanho e a saliva é secretada para lubrificar o bolo e permitir a deglutição (Beauchemin, 2018).

Apesar da remoção (absorção e passagem) de AGV ser o mecanismo predominante para evitar o desenvolvimento de acidose (Penner et al., 2009a), a secreção de saliva é um fator indispensável no processo fisiológico para manter o equilíbrio do rúmen, pois além da presença de tampões, a saliva representa a maior fonte de água para o ruminoretículo (Allen, 1997). Dessa forma, parece ser necessário um tempo mínimo de mastigação para minimizar o risco de acidose ruminal, melhorar a digestão de fibra e promover altos níveis de CMS (Beauchemin, 2018). Todavia, o uso de dietas com baixo teor de FDNfe reduz a atividade mastigatória (Zebeli et al., 2010b).

### **1.3. Fatores que interferem na formação do *mat* ruminal**

O atendimento das exigências mínimas de FDNfe é necessário para promover a formação do *mat* ruminal, o qual estimula a motilidade ruminal, a atividade de mastigação e a produção de saliva (Allen, 1997; Zebeli et al., 2012a; Humer, et al., 2018). Enquanto a FDNfe contribui para manutenção do normofuncionamento ruminal, o excesso de FDNfe pode limitar o CMS (Mertens, 1987; Zebeli et al., 2012a).

Maior pH ruminal e tempo de retenção são frequentemente associados à ingestão de partículas mais longas (Allen, 1997), o que poderia aumentar a digestibilidade da FDN. Por outro lado, o aumento da área de superfície para fixação bacteriana com partículas mais curtas poderia contribuir para aumentar a digestibilidade da FDN (Johnson et al., 1999). Porém, a combinação de tamanho de partícula menor e gravidade específica maior contribuem para reduzir o tempo de retenção dos alimentos no rúmen, o que aumenta o escape da FDN potencialmente digestível para o trato digestório inferior e, por consequência, pode diminuir a digestibilidade de FDN no trato total (Firkins, 1997).

A comparação de silagem de milho não processada colhida com 9,5 mm de comprimento teórico de corte com a silagem de milho processada colhida a 9,5, 14,5 ou 19,0 mm, resultou em maior consistência do *mat* ruminal (maior tempo de ascensão) para a dieta com silagem de milho não processada ou processada com 19,0 mm (Bal et al., 2000). Esse resultado diz respeito ao maior tamanho médio de partículas ingeridas, proporcionando maior consistência do *mat* ruminal.

Definir o tamanho de partícula ideal para bovinos de leite tem se mostrado historicamente difícil, pois, apresentam efeitos antagônicos no desempenho animal. Por um lado, a alimentação com partículas longas de forragens aumenta o teor de FDNfe na dieta, com efeitos positivos na ruminação e no tamponamento ruminal, diminuindo o risco de acidose ruminal (Mertens, 1997). De outro lado, o aumento do tamanho de partículas

aumenta a seleção no cocho, diminui a taxa de passagem da digesta e pode diminuir o CMS (Storm e Kristensen, 2010; Miller-Cushon e DeVries, 2017b).

Avaliando o tamanho de partículas de diversos alimentos antes e depois de serem deglutidos, Schadt et al. (2012) constataram que, independentemente do tamanho inicial de partículas ofertadas ao animal, as vacas mastigavam as partículas da dieta até que atingissem aproximadamente 10 a 11 mm de tamanho médio antes da deglutição. Santini et al. (1983) estimaram que o ponto abaixo do qual o comprimento das partículas afetou o tempo total de mastigação foi de aproximadamente 10 mm. Em estudo avaliando combinações de FDNi e FDNfe na dieta, Grant et al. (2018) encontraram que para todas as dietas o tamanho médio das partículas deglutidas foi de 7 a 8 mm. Portanto, a oferta de partículas com tamanhos muito superiores aos descritos acima tem maior potencial para influenciar o tempo de ingestão do que o tempo de ruminação, além de aumentar o risco de seleção de partículas no cocho. O maior tempo de alimentação pode limitar o CMS em animais de alta produção ou em instalações com superlotação, sem resultar em melhorias do ambiente ruminal (Ferrareto e Grant, 2018; Grant et al., 2018).

## **2. Mecanismos de tamponamento da digesta ruminal**

A fermentação ruminal produz ácidos orgânicos que prontamente se dissociam e contribuem para diminuir o pH ruminal (Allen, 1997). Enquanto o aumento da produção de AGV é desejável nutricionalmente, o acúmulo de prótons na digesta pode significar um desafio para o ecossistema ruminal e também para saúde animal (Allen, 1997; Aschenbach et al., 2011).

A degradação ruminal de carboidratos não fibrosos, principalmente o amido, é capaz de induzir uma redução rápida de pH, enquanto o aumento da FDNfe na ração é a medida nutricional mais eficiente para aliviar o declínio do pH após uma refeição (Allen, 1997; Zebeli et al., 2008a). Em condições nomofisiológicas de pH, a produção de 1 mol de AGV está inicialmente associada à liberação de 1 mol de  $H^+$ , podendo ser um pouco menor em dietas com maior proporção de forragens (Aschenbach et al., 2011). A variação na resposta de pH indica o balanço entre as taxas de produção e remoção de ácidos e de tamponamento de prótons (Aschenbach et al., 2011), ou seja, quando a taxa de produção de ácidos excede a taxa de remoção, o acúmulo de ácidos contribui para redução do pH ruminal (Plaizier et al., 2009). Os ácidos acumulados no rúmen podem ser tamponados até certo ponto pelo bicarbonato secretado no rúmen (mucosa ruminal e saliva) e pela capacidade de troca de cátions da digesta (Allen, 1997; Kohn e Dunlap, 1998).

O pH ruminal está relacionado negativamente com a concentração ruminal de AGV, mas a correlação é relativamente fraca (Allen, 1997). De acordo com Dijkstra et al. (2012), a baixa relação entre concentração de AGV e o pH ruminal está relacionada à grande variação entre a capacidade das dietas na capacidade de induzir tamponamento e remoção de AGV do rúmen, o que afeta a relação entre pH e AGV. Os AGV são removidos do rúmen por absorção pela parede ruminal e por passagem associados com a fração líquida (Dijkstra et al., 1993; Allen, 1997; Aschenbach et al., 2009; Dijkstra et al., 2012).

## **2.1. Remoção de AGV por absorção ruminal**

A absorção dos AGV desempenha um papel fundamental no controle da acidose (Aschenbach et al., 2011). Os mecanismos de absorção de AGV pela parede ruminal foram revisados por Gäbel et al. (2002) e Aschenbach et al. (2009). Três principais mecanismos foram definidos: (1) absorção de AGV não dissociado por meio de difusão passiva lipofílica; (2) absorção de AGV dependente de bicarbonato; e (3) absorção de AGV independente de bicarbonato.

### *2.1.1. Transporte de AGV não dissociado por meio de difusão passiva*

Um modelo simples de absorção de AGV propõe que os três principais AGV atravessam a membrana apical por difusão passiva (Bugaut, 1987; López et al., 2003). Uma vez que há pouca ou nenhuma absorção passiva de AGV na forma dissociada ( $AGV^-$ ), sendo praticamente impermeável à membrana (Ash e Dobson, 1963; Gäbel et al., 2002), a difusão passiva é atribuída à forma não dissociada dos AGV (AGVH) (Gäbel et al., 2002; Walter e Gutknecht, 1986). A absorção passiva de AGVH contribui diretamente para a estabilização do pH ruminal, pois os prótons ( $H^+$ ) são eliminados juntamente com os ânions ( $AGV^-$ ) (Dijkstra et al., 2012). Assim, a absorção de AGVH resulta na remoção líquida de íons hidrogênio do rúmen (Aschenbach et al., 2011). Entretanto, em faixas de pH ruminal consideradas normais, há pouco AGV na forma não dissociada. Considerando a equação de Henderson-Hasselbalch ( $pH = pka + \log AGV^-/AGVH$ ), em pH 6,0, aproximadamente 6% dos AGV estão presentes na forma não dissociada e em valores mais altos de pH, menores proporções de AGV se encontrarão na forma não dissociada. Portanto, em condições normofisiológicas, a absorção de AGV no rúmen deve ocorrer principalmente sob a forma dissociada dos AGV.

### 2.1.2. Transporte de AGV dependente de bicarbonato

A principal via de absorção não difusional do AGV<sup>-</sup> foi identificada como a troca iônica de AGV<sup>-</sup> por bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Gäbel et al., 2002). Logo, a parede ruminal é uma importante fonte de bicarbonato, que pode ser formado no epitélio ruminal pela hidratação do CO<sub>2</sub> catalizada pela anidrase carbônica, no entanto, é principalmente obtido do sangue (Gäbel et al., 2002; Aschenbach et al., 2009). O HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretado no rúmen entra no sistema tampão duplo aberto de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, onde se combina com o H<sup>+</sup> para formar H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, que se dissocia em CO<sub>2</sub> e água no rúmen (Aschenbach et al., 2011).

A secreção de bicarbonato pela mucosa ruminal é um importante mecanismo de regulação do pH intraruminal. Um comparativo da contribuição da saliva e do epitélio ruminal para o fluxo de bicarbonato no rúmen de bovinos alimentados com dieta rica em volumoso ou rica em concentrado foi feito por Dijkstra et al. (2012) (Tabela 1). Com base nesses dados verifica-se que a contribuição de bicarbonato pelo epitélio ruminal é superior do que o bicarbonato proveniente da saliva e muito maior que a quantidade de bicarbonato de sódio normalmente fornecido dieteticamente.

**Tabela 1.** Fluxo de bicarbonato no rúmen de bovinos

	Alto volumoso	Alto concentrado
CMS (kg/d)	20	20
Produção de saliva (L/dia)	250	200
Produção de AGV (mol/d)	100	120
Fluxo total de bicarbonato (g/d)	4010	4245
Via saliva (g/d)	1875	1500
Via epitélio ruminal (g/d)	2135	2745

Fonte: Adaptado de Dijkstra et al. (2012). Os autores não relataram quais foram os níveis de volumoso e concentrado usados no cálculo da estimativa do fluxo de bicarbonato.

### 2.1.3. Transporte de AGV independente de bicarbonato

As taxas de produção de AGV (ac > pr > bu) estão inversamente relacionadas à sua permeabilidade lipofílica (bu > pr > ac; Walter e Gutknecht, 1986) e às taxas de metabolismo intracelular (bu > pr ≥ ac; Kristensen et al., 2000; Kristensen e Harmon, 2004). Pelos motivos acima citados, vias de absorção adicionais são importantes pelo menos para os ácidos acético e propiônico (Aschenbach et al., 2011). Além da absorção passiva e da troca iônica de AGV com bicarbonato, parecem existir outras formas de absorção independentes de bicarbonato (Aschenbach et al., 2009).

Nas últimas duas décadas vários mecanismos de absorção de AGV dependentes de proteínas foram descobertos, no entanto, a identidade molecular dessas proteínas é incerta (Aschenbach et al., 2011). Uma das possibilidades parece envolver o transportador monocarboxilato 1 (MCT1) e canais aniônicos permeáveis para grandes ânions (Aschenbach et al., 2011). Porém, apenas o MCT1 foi inequivocamente localizado na membrana basolateral, envolvido no transporte de corpos cetônicos, oriundos do metabolismo intracelular do butirato e do lactato proveniente do metabolismo de glicose e propionato (Rémond et al., 1995; Müller et al., 2002; Kirat et al., 2006).

#### *2.1.4. Fatores que influenciam na absorção de AGV*

À medida que o pH ruminal diminui, a taxa fracional de absorção de ácidos aumenta (Danielli, et al. 1945; Dijkstra et al., 1993; Melo et al., 2013), pois aumenta-se a proporção de AGV na forma não dissociada (Dijkstra et al., 1993). A taxa de absorção de AGV não dissociado depende do comprimento da cadeia ( $bu > pr > ac$ ) devido a permeabilidade lipofílica desses AGV (Walter e Gutknecht, 1986). No entanto, em condições de pH mais próximos da neutralidade, a taxa fracional de absorção parece ser semelhante entre os AGV (Resende Junior et al., 2006; Aschenbach et al., 2011), graças a menor importância do mecanismo de absorção por difusão passiva.

A taxa fracional de absorção de AGV pode ser elevada com a maior motilidade ruminal (Allen, 1997), aumento da área de superfície das papilas ruminais (Dirksen et al., 1985; Melo et al., 2013) e diminuição do volume de fluido ruminal (Dijkstra et al., 1993), embora o efeito do volume de digesta sobre a absorção de AGV não seja consistente (Melo et al., 2013). As alterações adaptativas da superfície das papilas ruminais e da capacidade metabólica da mucosa, dependendo da dieta (aumenta com o aumento de MO degradável no rúmen), são fatores importantes que afetam a suscetibilidade dos animais à acidose ruminal (Allen, 1997).

Outro fator importante a ser considerado é o fato de que dentro de um rebanho haverá animais mais susceptíveis a acidose ruminal subaguda (ARSA), pois, ao receber a mesma dieta e manejo semelhante, parte do rebanho pode estar saudável, mas alguns animais podem apresentar ARSA (Plaizier et al., 2008; Mohammed et al., 2012). As diferenças individuais na susceptibilidade a ARSA foram discutidas no trabalho de Yang et al. (2022). Dentro de um rebanho, vacas suscetíveis ou não suscetíveis a ARSA, foram separadas e avaliadas quanto as suas respostas a dieta. Vacas classificadas como susceptíveis apresentaram pH baixo por mais tempo e apresentaram diferenças na



microbiota ruminal, comparativamente às vacas que dificilmente tiveram queda de pH abaixo de 6,0 durante o período pós-parto (vacas não susceptíveis). Mais especificamente, a abundância relativa de bactérias produtoras de lactato, bem como, degradadoras de amido, foram aumentadas no rúmen de vacas susceptíveis a ARSA (Yang et al., 2022).

Durante a alimentação de dieta com alto concentrado há um aumento na expressão de genes relacionados ao sistema imunológico, isso pode ser desencadeado pelo aumento da translocação de LPS para o fígado (Chang et al., 2015). Esses achados fornecem nova compreensão sobre as contribuições do mecanismo epigenético para as respostas inflamatórias hepáticas em vacas leiteiras, e também como a dieta pode afetar a expressão de determinados genes. Os autores desse trabalho destacam que a modulação de mecanismos epigenéticos pode fornecer novas maneiras de tratar as respostas inflamatórias sistêmicas induzidas pela alimentação de uma dieta com alto concentrado (Chang et al., 2015).

## **2.2. Remoção de AGV por passagem**

De acordo com a revisão de Aschenbach et al. (2011), é amplamente aceito que entre 50 a 85% dos AGV produzidos no rúmen são absorvidos diretamente através da parede do ruminorretículo e o restante passa para o omaso. A maior remoção de AGV do rúmen por passagem está relacionado a maiores taxas de passagem de líquidos associadas a dietas à base de forragem fresca (Allen, 1997; Reis e Combs, 2000) ou níveis de consumo de energia elevados (4× manutenção vs. 1× manutenção; Tamminga e van Vuuren, 1988). A proporção de AGV removidos do rúmen por passagem frequentemente diminui com o menor pH ruminal (Dijkstra et al., 1993), mas aumenta com maior taxa de passagem de fluido ruminal (Allen, 1997; Resende Junior et al., 2006).

A entrada de água no rúmen acontece de diversas formas: ingestão de água, água dos alimentos e via saliva (Allen, 1997). Entretanto, o fluxo de água via saliva representa a principal fonte de água para o rúmen, com produção diária em torno de 200-250 L/d em vacas com CMS de aproximadamente 20 kg/d (Cassida e Stokes, 1986).

Quando a mistura não é completa, a água livre que os animais bebem pode ter pouco efeito na remoção de  $H^+$ . Em condições de restrição de líquidos por 4:30 h ou 9:00 h após a alimentação, 5% e 18% da água desviou do rúmen até o omaso (Woodford et al., 1984). Daniel et al. (2007) verificaram que 27,39% da água ingerida passou diretamente ao omaso. Esses resultados demonstram que a maior parte da água consumida chega

diretamente ao ruminorretículo, porém, essa quantidade ainda é inferior ao influxo de água via saliva.

Outra fonte de água para o rúmen, porém de menor expressão, é a movimentação de água através da parede ruminal. Os mecanismos que regem os movimentos da água do/para o rúmen operam a fim de minimizar as alterações ao equilíbrio osmótico entre o rúmen e os fluidos corporais, com uma quantidade significativa de entrada de água quando os valores de osmolaridade forem maiores que 370 mOsmol/L (Carter e Grovum, 1990). Em trabalho de Dijkstra et al. (1993) foi observado maiores volumes finais do fluido ruminal associados ao aumento da osmolaridade. Os AGV são considerados os principais determinantes da pressão osmótica do fluido ruminal (Dijkstra et al., 1993).

Considerando que a chegada de AGV em quantidades significativas no abomaso pode causar danos à mucosa (Bolten et al., 1976; Bödeker et al., 1994), a maior parte dos AGV carregados do rúmen com a fase fluida deve ser absorvida no omaso. Apesar da menor superfície absorptiva quando comparado ao rúmen (Daniel et al., 2006), a maior razão superfície absorptiva: massa de digesta e a maior velocidade de absorção de AGV por cm<sup>2</sup> de mucosa, comparativamente ao rúmen (Daniel e Resende Junior, 2012), tornam o omaso altamente eficiente para absorção de AGV.

### *2.2.1. Transporte de AGV na mucosa omasal*

A absorção de AGV no omaso é uma função fisiológica essencial desse compartimento (Ali et al., 2006). A taxa fracional de absorção ( $k_a$ ) de AGV pela superfície do epitélio do omaso foi cerca de 11 vezes maior que no rúmen (Daniel e Resende Junior, 2012). Os autores ainda acrescentam que a razão para essa diferença pode estar relacionada aos mecanismos de absorção na parede do órgão.

Os mecanismos de absorção ruminal de AGV já foram descritos anteriormente nessa revisão, porém, no omaso, foi demonstrado por Ali et al. (2006) a hipótese de difusão passiva do acetato que ocorre predominantemente na forma AGVH. Esse mecanismo não requer transportadores, mas tem a desvantagem de transportar prótons junto com o AGV para dentro da célula (Ali et al., 2006). Ao contrário do rúmen que secreta HCO<sub>3</sub>, o omaso apresenta absorção de HCO<sub>3</sub> e de AGV pela troca de Cl (von Engelhardt e Hauffe, 1975). Então, é provável que o omaso absorva AGV tanto pela troca iônica com o Cl quanto por difusão passiva, que parece ser facilitada pelo aumento da concentração de H<sup>+</sup> na superfície epitelial, causada por troca de H<sup>+</sup> com Na<sup>+</sup> e bombeamento de H<sup>+</sup> com gasto de ATP (Ali et al., 2006).

### 2.3. Importância da saliva

Após parte dos íons de hidrogênio serem removidos do rúmen por absorção e passagem de AGV, torna-se necessário neutralizar os íons remanescentes para controle do pH ruminal, sendo que, isso pode ocorrer pelo tamponamento, principalmente com o bicarbonato secretado via saliva e pela mucosa ruminal (Allen, 1997; Aschenbach et al., 2009). Allen (1997) descreve um exemplo com pH ruminal igual a 6,0 (volume de líquido de 80 L, 270 L de saliva), em que a absorção de AGV é capaz de neutralizar 52,9% dos íons  $H^+$  gerados durante a fermentação ruminal, 28% é neutralizado pela incorporação de  $H^+$  na  $H_2O$  pela desidratação do ácido carbônico, outros 8,9% saem do rúmen como dihidrogenofosfato e os <7% restantes saem do rúmen associados a AGV, amônia e material particulado (Allen, 1997).

A alcalinidade da saliva de ruminantes é conhecida há décadas e já originou muitos debates (Aschenbach et al., 2011). A saliva dos ruminantes contém fosfato e bicarbonato em concentrações muito maiores do que as das espécies não ruminantes, tornando-se um meio apropriado para tamponar os ácidos produzidos no rúmen (McDougall, 1948; Turner e Hodgetts, 1955). A produção média de saliva durante o repouso é de 133 mL/min (91-156) e a produção de saliva durante a refeição foi cerca de 1,6 vezes a do repouso, com média de 206 mL/min (192-250). Diante do exposto, pode ser assumido que a produção de saliva durante a ruminação seja quase a mesma que durante a refeição, pois é difícil de medir e não há estimativas disponíveis para vacas leiteiras de alta produção (Beauchemin, 2018).

As concentrações típicas de fosfato na saliva bovina são aproximadamente 20 a 30 mmol/L (Bailey e Balch, 1961), assumindo uma produção de saliva de 250 L/d (Cassida e Stokes, 1986), a secreção total de fosfato no rúmen pode atingir cerca de 6 mol/d em vacas leiteiras em lactação. O tampão  $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$  tem um pKa de 7,21, o que significa que a maior parte da capacidade de tamponamento reside na faixa de pH entre 8,21 e 6,21 ( $pK_a \pm 1$ ) (Aschenbach et al., 2011). O pH típico na saliva de uma vaca é de 8,2 a 8,5 (Bailey e Balch, 1961; Cassida e Stokes, 1986). Em exemplo elaborado por Aschenbach et al. (2011), assumindo pH ruminal de 6,2 ou menor,  $\geq 80\%$  de capacidade de tamponamento do fosfato pode ser usada quando a saliva é misturada com o conteúdo ruminal, isso significa que o fosfato tamponaria cerca de 5 mol/d de prótons no rúmen (Aschenbach et al., 2011).

O bicarbonato salivar tem capacidade de tamponamento maior que o fosfato, com concentrações típicas na saliva bovina de aproximadamente 120 mmol/L (Bailey e Balch, 1961). No que diz respeito a produção de saliva do exemplo anterior (250 L/d; Cassida e Stokes, 1986), a secreção total de  $\text{HCO}_3^-$  no rúmen pode chegar a 30 mol/d. Os íons de hidrogênio são incorporados à água, sendo que em pH 6,1 mais de 50% de sua capacidade tamponante é utilizado, isso para as condições do rúmen (solução aquosa em sistema aberto) e a concentração de  $\text{CO}_2$  dissolvido seja mantida em níveis relativamente constantes (Allen, 1997).

Apesar de a absorção de AGV ser o mecanismo predominante para neutralizar a acidez ruminal (Penner et al., 2009a), a secreção de saliva é um fator indispensável no processo fisiológico para manter o equilíbrio no rúmen (Allen, 1997). Com o uso de dietas com baixo teor de FDNfe ocorre a redução da atividade mastigatória (Zebeli et al., 2010b), e conseqüentemente, menor produção de saliva.

### **3. Acidose ruminal**

A acidose ruminal é o quadro resultante do acúmulo excessivo de ácidos no rúmen, que ocorre quando a taxa de produção excede a taxa de remoção de ácidos (absorção + passagem) (Allen, 1997; Owens et al., 1998; Stone, 2004) e, tem sido caracterizada quando o pH cai abaixo de um certo nível (e.g., < 5,8; Zebeli et al., 2008a) durante um determinado período (e.g., > 5.2 h/d; Zebeli et al., 2008a). A acidose ruminal pode reduzir o CMS, a digestão e a utilização de nutrientes, diminuir a capacidade de absorção e a barreira da túnica mucosa nos compartimentos do trato digestório, prejudicar a funcionalidade da microbiota gastrointestinal, reduzir a síntese de proteína microbiana e desencadear resposta inflamatória (Plaizier, et al., 2018).

Os distúrbios à saúde, resultantes de dietas com alto potencial de acidificação, são classificados como ARSA e acidose ruminal aguda (clínica), com base no grau de redução do pH ruminal e nos sinais clínicos apresentados pelos animais. A dinâmica do acúmulo de ácidos no ecossistema ruminal tem levado à diferentes definições e classificações de acidose entre os grupos de pesquisa (Aschenbach et al., 2011).

A taxa fracional de absorção de AGV é correlacionada positivamente com a superfície absorptiva do rúmen (Melo et al., 2013), e ambas são correlacionadas positivamente ao CMS digestível (Daniel et al., 2013). Como demonstrado por Danielli et al. (1945) a absorção de AGV tende a aumentar com o aumento da taxa de fermentação, quando o epitélio do proventrículo estiver saudável. A exposição a episódios repetidos de

baixo pH diminuiu a capacidade de absorção do epitélio ruminal (Harmon et al., 1985). Essa redução na absorção pode ser causada por inflamação ou paraqueratose da parede ruminal, elevando o risco da ocorrência de novos episódios de acidose ruminal (Dirksen et al., 1985; Penner et al., 2009a; Plaizier et al., 2009). A redução na taxa fracional de absorção de AGV, como consequência da ARSA, é provavelmente um mecanismo para prevenir a acidificação intracelular bem como danos aos tecidos relacionados a absorção excessiva de AGV (Plaizier et al., 2018).

### **3.1. Acidose ruminal subaguda**

A ARSA pode ser considerada a manifestação da forma leve de acidose (Aschenbach et al., 2011). Baseado nas mudanças na composição e atividade microbiana, um primeiro limite de pH em torno de 5,8 é justificado, o qual coincide com o primeiro limiar de vulnerabilidade do epitélio ruminal, pois, respostas inflamatórias iniciais podem acontecer quando o pH ruminal é menor que 5,6 por mais de 3 h (Gozho et al., 2007).

Os limiares de pH ruminal para caracterizar a ARSA são considerados dependendo do local de coleta ou do tempo de permanência abaixo de um determinado valor de pH. Como por exemplo: <5,8 quando as amostras de pH são coletas no saco ventral (Zebeli et al., 2008a); <6,0 quando as amostras são oriundas do retículo (Neubauer et al., 2018); pH ruminal <5,6 por mais de 3 h (Plaizier et al., 2008); pH <5,8 por mais de 5,2 h (Zebeli et al., 2008a); mais de 283 min em pH <5,6 (AlZahal et al., 2007) ou mais de 475 min de pH <5,8 (AlZahal et al., 2007).

O pH ruminal é uma boa opção para diagnosticar a ARSA, porém, o pH do rúmen varia consideravelmente dependendo do local, horário e método de coleta (Colman et al., 2010; Garrett et al. 1999). Alguns trabalhos pretenderam propor valores de pH para diagnosticar ARSA considerando as diferenças entre os métodos de coleta. Por exemplo, Duffield et al. (2004) propuseram valores menores que 5,5, 5,8 e 5,9 quando as amostras de fluido ruminal são coletadas por ruminocentese, amostragem do saco ventral através de cânula ruminal ou usando sonda oral, respectivamente. Aschenbach et al. (2011) consideram que o termo “pH ruminal” é frequentemente usado como sinônimo de “pH ruminal ventral”, pois, considera-se que o saco ventral fornece informações mais integradas sobre o status do pH de todo o rúmen, desde que a motilidade esteja normal.

Alguns efeitos decorrentes da ARSA podem incluir redução e variação de CMS, queda do teor de gordura do leite, redução da digestibilidade da fibra, diminuição da motilidade ruminal, timpanismo, abscesso hepático, reduzir a capacidade de absorção e

da integridade da túnica mucosa nos compartimentos do trato digestório, prejudicar as funcionalidades da microbiota gastrointestinal e também desencadear respostas inflamatórias (Colman et al., 2010; Nocek, 1997; Plaizier, et al., 2018).

### 3.2. Acidose ruminal aguda

Um segundo limite existe conforme o pH diminui para valores abaixo de 5,0 (Aschenbach et al., 2011) e coincide com a vulnerabilidade do epitélio ruminal, onde um comprometimento imediato e persistente da função de transporte e barreira ocorre em pH  $\cong 5,1$  (Gaebel et al., 1987; Gaebel e Martens, 1988; Aschenbach e Gäbel, 2000). Para acidose ruminal aguda é assumido valores  $<5.0-5.2$  (Dirksen et al., 1985; Nocek, 1997; Owens, 1998; Penner et al., 2007). Nessa condição de pH pode haver redução da população de protozoários ruminais e inicia-se o acúmulo de ácido láctico, o que parece ser atribuível principalmente devido ao crescimento excessivo de *Streptococcus bovis* (Hungate et al., 1952; Gill et al., 2000; Stone, 2004).

Quando dietas ricas em amido são consumidas, as bactérias amilolíticas proliferam e produzem AGV e ácido láctico (Nagaraja et al., 1998). Mas em animais adaptados à dieta rica em amido, o lactato não se acumula no ambiente ruminal porque pode ser convertido em propionato via acrilil-CoA por bactérias como *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium* (Mackie et al., 1984; Goad et al., 1998). Na literatura há controvérsias quanto a absorção de lactato no proventriculo de ruminantes, alguns trabalhos relatam absorção (Rowe et al., 1998), por outro lado, outros indicam não haver absorção (Huntington et al., 1980; Harmon et al., 1985). Um trabalho recente demonstrou que a absorção de lactato foi maior na quarta semana de administração de uma dieta com 60% de concentrado em comparação com o dia zero, tanto para animais que receberam essa dieta sem interrupção (desafio contínuo), como para animais que tiveram uma interrupção de uma semana (desafio interrompido) e depois retornaram na mesma dieta (Qumar et al., 2016). Esse trabalho demonstrou que o lactato pode ser absorvido, mas para isso é necessário o fornecimento de uma dieta rica em grãos por pelo menos 2 semanas quando os animais são reexpostos a uma dieta com alto concentrado ou 4 semanas de consumo contínuo de uma dieta com alto teor de amido (Qumar et al., 2016).

Um acúmulo  $\geq 5$  mmol/L de lactato foi sugerido como o limite para predispor o ruminante à acidose ruminal aguda (Nocek, 1997). O ácido láctico é um ácido mais forte do que os AGV e, em casos de acidose aguda, contribui para a diminuição do pH (Dijkstra et al., 2012). Entretanto, a ocorrência de acidose aguda com acúmulo de ácido láctico em

vacas leiteiras é de importância limitada comparada à ocorrência de acidose subaguda (Aschenbach et al., 2011; Mackie et al., 1984; Goad et al., 1998).

### 3.3. Fatores predisponentes à acidose subaguda

Krause e Oetzel (2006) sugeriram que as três principais causas de ARSA existente em rebanhos leiteiros são: ingestão excessiva de carboidratos rapidamente fermentáveis, adaptação ruminal inadequada para dieta altamente fermentável e tamponamento ruminal inadequado causado por baixa proporção de fibra na dieta ou tamanho inadequado de partículas da forragem. Vacas que consomem dietas com teor adequado de FDN, mas com partículas finamente picadas, também podem exibir os mesmos problemas que as vacas alimentadas com dieta deficiente em FDN. Logo, a adequação física da dieta é necessária para o funcionamento adequado do rúmen. Partículas de forragem com tamanho muito pequeno tendem a diminuir o pH ruminal (Woodford e Murphy, 1988), pois, reduzem o tempo de mastigação, produzindo menor volume de saliva (Sudweeks et al., 1981), diminuem a consistência do *mat* ruminal e a motilidade (Mertens, 1997; Zebeli et al., 2012a), o que deve reduzir a taxa fracional de absorção de AGV (Aschenbach et al., 2011). Animais com menor capacidade de absorver AGV apresentam maiores chances de desenvolver ARSA (Penner et al., 2009a).

Em estudo de Grant et al. (1990), vacas alimentadas com uma ração finamente picada, ruminaram 2,5 h a menos do que vacas alimentadas com uma ração contendo forragem grosseira, e o menor tempo de ruminação diminuiu a produção de bicarbonato nessas vacas em 258 g/d. O outro extremo (partículas muito grandes) também é indesejável, pois, mesmo que uma dieta seja formulada com níveis adequados de FDNfe, a seleção contra partículas longas leva a ingestão de uma ração diferente daquela formulada, resultando em menor capacidade de tamponamento ruminal (Plaizier et al., 2009).

Erros na mistura da dieta, diferenças entre os teores de MS reais e estimados dos ingredientes e o excesso de tempo de mistura no vagão são fatores que podem aumentar o risco de ARSA (Kleen et al., 2003). O excesso de mistura tem como consequência a redução no tamanho de partículas, enquanto a menor eficiência de mistura pode fazer com que a ração total misturada (RTM) seja heterogênea ao longo do cocho (Heinrichs, 2013). Depois que a forragem é picada, ela pode ser manuseada por diversos equipamentos mecânicos que podem reduzir ainda mais o tamanho das partículas. Especificamente, os descarregadores de silo e misturadores de RTM podem contribuir para a diminuição do

tamanho das partículas de forragem (Lammers et al., 1996). A fragmentação de partículas da RTM pode resultar em dietas com teores de FDNfe menores do que o esperado (Kleen et al., 2003; Stone, 2004). Dietas super misturadas, com tempo de mistura muito além do ideal, podem resultar em RTM com menor estruturação física e maior facilidade para ingestão (Nordlund et al., 1995).

Especialmente em condições de alimentação em grupo, com competição entre os animais, a seleção de partículas ao longo do dia pode levar a ingestão de ração com composição diferente da formulada e causar prejuízos ao desempenho e à saúde dos animais (Grant e Ferraretto, 2018). Frequentemente, a fração de partículas da RTM retida na peneira de 19 mm do PSPS é a mais provável de sofrer seleção contrária. Para os animais alimentados em grupo, com superlotação e dietas passíveis de seleção, as vacas dominantes terão a oportunidade de selecionar o melhor material, ingerindo uma ração que fermenta mais rápido e que pode induzir ARSA. Para os animais submissos, conseqüentemente, restará uma ração de menor qualidade (maior teor de FDN) e possivelmente esses animais não serão capazes de ingerir a quantidade planejada, seja por enchimento do trato gastrointestinal ou por limitação do tempo de ingestão em dietas com maior tamanho de partículas (Grant e Ferraretto, 2018).

Geralmente a maior atividade de ingestão de alimentos ocorre depois que a RTM é fornecida no cocho ou empurrada ao longo do dia, pois os animais estão condicionados. Mesmo em dietas fornecidas na forma de RTM pode haver seleção de partículas, especialmente se as partículas de forragem forem muito longas. Logo, essa separação da ração pode aumentar o risco de ARSA (Beauchemim, 2019). O aumento da frequência de fornecimento ou aproximação da RTM no cocho pode reduzir a seleção da ração (Miller-Cushon e DeVries, 2017b). Portanto, ao longo do dia, a distribuição frequente da RTM tende a promover a atividade alimentar e uma distribuição mais uniforme do tempo de alimentação, o que ajuda a minimizar a queda de pH ruminal. Adequar a taxa de lotação (i.e., espaço de cocho) reduz a competição no cocho e frequentemente reduz a taxa de ingestão e aumenta o tempo de mastigação (Crossley et al., 2017), podendo reduzir o risco de ARSA.

#### **4. Tamanho de partículas da silagem de milho**

Alterar o tamanho de partículas da silagem de milho frequentemente resulta em modificações no CMS, no ambiente ruminal e no desempenho dos animais. Reduzir o tamanho teórico de corte pode aumentar o CMS em dietas com maior inclusão de



ferragem (Nasrollahi et al., 2015) e diminuir a seleção de partículas no cocho (DeVries et al., 2008), porém pode reduzir a motilidade do ruminorretículo, a ruminação e a secreção de saliva, ocasionando acúmulo de AGV e redução do pH ruminal (Mertens, 1997). Por outro lado, o fornecimento de ferragens com tamanho de partícula apropriado, em proporção adequada, induz a formação de *mat* com consistência adequada, estimula a motilidade ruminal e a ruminação, promovendo a saúde e o desempenho dos animais (Clauss et al., 2011; Salvati et al., 2021).

Várias configurações de máquinas têm sido adotadas para colheita e processamento da silagem de milho. Aumentar o tamanho teórico de corte frequentemente causa deslocamento na distribuição de partículas da peneira de 8 mm para a peneira de 19 mm, favorecendo a seleção contra partículas longas e resultando no consumo de FDNfe menor do que o planejado (Zebeli e Humer, 2017). Enquanto isso, o aumento na uniformidade da dieta com a diminuição moderada do comprimento teórico de corte pode reduzir a seleção de partículas e aumentar a quantidade absoluta de FDNfe ingerida (Nasrollahi et al. 2015). Em trabalho de Zebeli e Humer (2017), o compilado de estudos realizados com silagem de milho mostrou que reduzir o tamanho teórico de corte de 23,3 mm para 10,2 mm resultou em maior CMS (+0,6 kg/d), produção de leite (+0,3 kg/d), e teor de proteína do leite (+0,02%), mas diminuiu o teor de gordura do leite (-0,02%). Na revisão de Nasrollahi et al. (2016), a redução do tamanho de partículas da silagem de milho resultou em menor tempo de ingestão, ruminação e pH ruminal, e aumentou a concentração total de AGV e proporção de butirato no fluido ruminal. Por outro lado, Bal et al. (2000) avaliando o efeito de diversos tamanhos teóricos de corte da silagem de milho (9,5, 14,5 e 19 mm) não verificaram alterações nos tempos de ingestão, ruminação e mastigação (ingestão + ruminação). Apesar disso, maior consistência do *mat* ruminal foi encontrada para o maior tamanho de corte (Bal et al., 2000).

Recentemente, Salvati et al. (2021) avaliaram três comprimentos teóricos de corte (6, 12 e 18 mm) em colhedora de ferragem autopropelida com rolo processador. Os autores verificaram que reduzir o tamanho de corte de 12 mm para 6 mm aumentou o teor de proteína do leite e diminuiu o tempo de mastigação. Porém, aumentar de 12 mm para 18 mm diminuiu o teor e a produção de lactose, a digestibilidade aparente do amido e tendeu a diminuir a produção de leite e a concentração plasmática de glicose. Os autores concluíram que o corte teórico de 12 mm, apresentou o melhor cenário para a máquina, a maturidade da planta e o híbrido (endosperma vítreo) adotados no estudo, pois representa um equilíbrio entre desempenho e a saúde dos animais (Salvati et al., 2021). Porém,

máquinas e regulagens diferentes frente às lavouras de milho em condições diferentes devem resultar em cenários distintos ao do estudo anterior. Por isso, conhecer a efetividade de cada fração da silagem de milho estratificada com o PSPS deve auxiliar na regulação da máquina no momento da colheita.

### **5. Efeitos ruminais e metabólicos da ARSA**

Muitos são os efeitos decorrentes da ARSA, seja diretamente no ambiente ruminal ou no metabolismo do animal. O fornecimento excessivo de grãos e a acidose ruminal resultante reduzem a riqueza, a uniformidade e a diversidade de microrganismos benéficos no ambiente ruminal (Khafipour et al., 2009c e 2016) e no intestino grosso (Plaizier et al., 2017). Sabe-se que dietas com alto teor de amido e as reduções prolongadas no pH ruminal inferior a 6,0, estimulam o crescimento de bactérias amilolíticas (Mackie e Gilchrist, 1979), enquanto as bactérias celulolíticas e a digestibilidade do FDN são simultaneamente diminuídas (Russell e Wilson, 1996; Krajcarski-Hunt et al., 2002).

A diminuição do pH ruminal tem contribuição significativa para a redução na digestibilidade da fibra, bem como a eficiência alimentar das vacas (Allen e Mertens, 1988; Zebeli et al., 2010a). A redução na digestibilidade da FDN provavelmente é o resultado da sensibilidade das bactérias fibrolíticas do rúmen ao pH ruminal abaixo de 6,0 (Shi e Weimer, 2002). Algumas das consequências da redução da digestibilidade da fibra são o menor teor energético da dieta e a redução no CMS (Allen, 2000).

A maior produção de AGV observada com o fornecimento de dietas com alta proporção de carboidratos rapidamente fermentáveis no rúmen pode acarretar redução da motilidade ruminal (Leek e Harding, 1975; Slyter et al., 1976). Dentre os AGV, o ácido butírico apresenta a maior capacidade de inibir a motilidade (Crichlow and Chaplin, 1985; Crichlow, 1988). A redução da motilidade pode depender de um efeito direto dos AGV na musculatura do ruminorretículo ou nos neurônios do plexo mioentérico, e não apenas pelo reflexo vagal (Gregory, 1987). Como o ácido butírico ativou uma proporção maior de receptores epiteliais do ruminorretículo do que o ácido acético ou o ácido propiônico, isso pode ser a razão para sua maior capacidade em induzir a perda de contrações do ruminorretículo em ovelhas que receberam infusões desses AGV (Crichlow, 1988).

A redução da motilidade também tem sido associada com endotoxinas bacterianas, com observações de hipomotilidade ruminal envolvendo toxemia em casos de mastite induzida por coliformes (Verheiden et al., 1981; Hoeben et al., 2000). Também há relatos

de que após a infusão intravenosa de histamina em ovelhas a motilidade ruminal foi inibida (Kania et al., 1994)

A redução da motilidade ruminal pode acarretar consequências como menor CMS (Kleen et al., 2003), acúmulo de gases, contato reduzido da digesta com o epitélio e menor absorção de AGV (Aschenbach et al., 2011) e distribuição desuniforme do bicarbonato secretado pela mucosa ruminal (Aschenbach et al., 2011). Dietas capazes de promover *mat* ruminal consistente e denso, geralmente resultam em normofunção ruminal, pois por meio de estimulação física, o *mat* ruminal favorece a ruminação e a motilidade ruminal (Allen, 1997; Zebeli et al., 2012a; Humer, et al., 2018).

Outra alteração no ambiente ruminal induzida pela ARSA é a elevação da temperatura ruminal (Alzahal et al., 2008). Nesse trabalho foi testado a dieta controle contra uma dieta capaz de induzir a ARSA e constatou-se que a temperatura ruminal relacionou-se inversamente ao pH ruminal. As vacas com ARSA induzida tiveram temperatura média mais alta e tempo maior (min/d) de temperatura acima de 39,0 e 39,2°C.

O baixo teor de gordura do leite é um dos efeitos mais comuns da ARSA em vacas leiteiras (Nocek, 1997). Muitas teorias foram propostas para explicar a redução da gordura do leite envolvendo mudanças na fermentação ruminal ou metabolismo intermediário (Griinari et al., 1998). Inicialmente, pensou-se que a redução da gordura do leite poderia estar relacionada a uma escassez de acetato ou  $\beta$ -hidroxibutirato, pois, alterações na fermentação ruminal com redução na razão acetato:propionato é característica em várias situações de dietas que resultam na redução da gordura do leite (Van Soest, 1963; Sutton, 1989). A razão acetato:propionato pode mudar, mas não há falta de acetato, pois as dietas associadas a redução no teor de gordura geralmente apresentam maior produção total de AGV, inclusive acetato. A razão alterada se deve ao fato de que o aumento na produção de propionato é maior que o aumento na produção de acetato.

Em estudo, avaliando a infusão ruminal de acetato (0, 5, 10 e 15 mol/d) foi verificado uma clara relação dose-resposta entre a oferta de acetato e a síntese de gordura do leite, em que, o teor de gordura aumentou linearmente e a produção de gordura apresentou efeito quadrático com o aumento da infusão de acetato (Urrutia e Harvatine, 2017). Vale ressaltar que esse experimento foi elaborado com dietas com baixa capacidade de causar ARSA. O aumento na síntese de gordura do leite é predominantemente por meio de um aumento no rendimento e concentração de AG de 16

carbonos, enquanto a síntese de AG <16 carbonos sintetizados de novo foi ampliada em menor grau (Urrutia e Harvatine, 2017).

Outra teoria para a redução de gordura do leite, é a teoria da insulina glicogênica. A ingestão excessiva de energia reduz a sensibilidade à insulina e induz à resistência a insulina em vacas leiteiras (Leiva et al., 2014, 2017). A glândula mamária é relativamente não responsiva à insulina e, dietas que elevam a insulina circulante resultam em canalização preferencial de precursores lipogênicos para a gordura corporal (Sutton, 1989; Leiva et al., 2017). A redução da gordura pode ser uma consequência da falta de precursores lipogênicos para a síntese de gordura do leite (Leiva et al., 2017) devido a canalização para reservas corporais. No entanto, resultados de pesquisas não suportam essa teoria, e sugerem que a insulina desempenha pouco ou nenhum papel na redução da gordura do leite (Corl et al., 2006).

Um possível mecanismo de redução da gordura do leite envolve a produção de metabólitos no rúmen que inibem a síntese mamária da gordura do leite (Griinari et al., 1998). Em condições de baixo pH ruminal há alterações tanto na população microbiana, quanto na extensão da biohidrogenação, ou de seu padrão, ou de ambos (Colman et al., 2010). Alterando a formação de cis-9 trans-11 C18:2 e trans-11 C18:1 para a formação de trans-10 cis-12 C18:2 e trans-10 C18:1 como principais intermediários da biohidrogenação do ácido linoleico (Griinari et al., 1998; Conte et al., 2018; Dewanckele et al., 2020). De acordo com Conte et al. (2018), maior correlação com a redução da gordura do leite foi encontrada com o AG trans-10 cis-12 C18:2 e trans-10 C18:1. Na revisão de Dewanckele et al., (2020) é relatado que o AG trans-10 cis-12 C18:2 realmente exerce propriedades antilipogênicas, no entanto, este AG sozinho não pode explicar todos os casos de redução da gordura do leite, já o trans-10 C18:1 pode estar (parcialmente) envolvido na redução da gordura do leite.

Esses intermediários estão envolvidos na inibição da atividade das enzimas acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintetase na glândula mamária, responsável pela síntese de novo dos AG com até 16 carbonos (Piperova et al., 2000; Baumgard et al., 2002). Normalmente, os ácidos graxos insaturados da dieta são completamente hidrogenados no rúmen, o que explica o motivo da gordura da carne de ruminantes ser saturada (Mertens e Grant, 2020). Sob condições de baixo pH ruminal, as gorduras poliinsaturadas são apenas parcialmente hidrogenadas, o que produz ácidos graxos bioativos, como C18:2 trans-10, cis-12, que tem efeitos marcantes no metabolismo lipídico no animal, resultando na redução de gordura do leite (Griinari et al., 1998; Baumgard et al., 2002). Tanto um

ambiente ruminal alterado quanto a presença de AGI na dieta são condições necessárias para diminuição substancial na porcentagem e produção de gordura do leite (Griinari et al., 1998).

Bovinos alimentados com dieta rica em concentrado são mais propensos a desenvolver problemas locomotores (Kleen et al., 2003). Descoloração do casco, hemorragias de sola, úlceras e abscessos, cascos deformados ou solas de parede dupla foram relatados em animais com ARSA (Nordlund et al., 1995; Oetzel, 2000). A observação de alterações microscópicas no processo de queratinização em bovinos com distúrbios nos membros locomotores (Andersson e Bergman, 1980; Singh et al., 1992), pode ser um fator que predispõe ao aparecimento de problemas podais por atuar sobre a morfologia e a dureza dos cascos bovinos (Budras et al., 1996; Hendry et al., 1999). Danos morfológicos no tecido epitelial do rúmen e dos cascos podem ter os AGV como causa comum (butirato), possivelmente explicando a ocorrência simultânea de anomalias no rúmen e nos cascos de bovinos sujeitos à acidose ruminal (Costa et al., 2008).

A ocorrência de ARSA é frequentemente citada como uma das razões para uma baixa condição corporal (Nordlund et al., 1995; Nocek, 1997; Oetzel, 2000). Isso pode ser devido a inflamação crônica, que pode presumivelmente antagonizar a deposição tecidual, pela liberação de citocinas, geralmente opostas ao anabolismo, bem como diminuir o CMS em uma situação de saúde prejudicada (Webel et al., 1997; Oetzel, 2000).

A diminuição do CMS tem sido usada como um sinal para diagnosticar ARSA (Kleen et al., 2003; Oetzel, 2003). Essa redução no CMS, com o aumento da acidez ruminal, pode ocorrer devido à redução na digestibilidade da fibra (Plaizier et al., 2001), aumento de ácidos graxos voláteis, especialmente propionato (Allen, 2000) e na osmolaridade no rúmen (Gozho et al., 2006a). Mas, a ARSA tem maior influência na variação diária de consumo do que propriamente redução de CMS do lote, com variações maiores observadas em animais com ARSA.

Em bovinos, a formação de D-lactato foi primeiramente reportada como consequência de acidose ruminal aguda devido ao excesso de grãos (Dunlop e Hammond, 1965). A fermentação de carboidratos no rúmen produz os dois isômeros do ácido láctico (D e L), entre outros compostos (Lorenz et al., 2003). Como os mamíferos não possuem mecanismo específico para a metabolização de D-lactato, o acúmulo deste isômero no sangue após a absorção no rúmen pode dar origem à acidose metabólica (Gentile et al., 2004). Valores de D-lactato no sangue de ruminantes encontrados na literatura estão compilados na Tabela 2. Os dados são apresentados com a unidade informada pelos

autores. Considerando que a acidose D-láctica é caracterizada por aumento na concentração sanguínea de D-lactato para valores  $\geq 3$  mmol/L (Urribari et al., 1998), depreende-se que, na maioria dos casos, aumentos nas concentrações sanguíneas de D-lactato possam ser interpretados como indicação de SARA, mas não como a causa do distúrbio.

**Tabela 2.** Concentrações de D-lactato no sangue de ruminantes

Referência	Descrição	Concentração	Unidade
<i>Vacas em lactação</i>			
Salvati (2019)	Silagem de milho com diferentes tamanho de partículas	1,38-1,56	mM
Pereira (1999)	Controle negativo (sem bicarbonato)	46,4	$\mu$ M
Pereira (1999)	Baixa forragem e alta FDN (sem bicarbonato)	41,3	$\mu$ M
Pereira (1999)	Controle positivo (sem bicarbonato)	41,4	$\mu$ M
Pereira (1999)	Controle negativo (com bicarbonato)	45,4	$\mu$ M
Pereira (1999)	Baixa forragem e alta FDN (com bicarbonato)	43,1	$\mu$ M
Pereira (1999)	Controle positivo (com bicarbonato)	40,6	$\mu$ M
<i>Novilhas</i>			
Rodrigues (2018)	Dieta contendo grão de milho inteiro com e sem bagaço de cana	100-160	$\mu$ mol/ $\mu$ L
Harmon et al. (1985)	Média-Dieta com 70% de concentrado	0,15	mM
Harmon et al. (1985)	Média-Dosados intraruminalmente com glicose	2,39	mM
Harmon et al. (1985)	Dieta com 70% de concentrado	<1,00	mM
Harmon et al. (1985)	Dosados intraruminalmente com glicose (pico com 26 h)	4,80	mM
Dunlop e Hammond (1965)	Antes da infusão de milho moído (62 g/kg de PV)	0,00	mM
Dunlop e Hammond (1965)	6,25 h após a infusão de milho moído (62 g/kg de PV)	7,00	mM
Dunlop e Hammond (1965)	10,17 h após a infusão de milho moído (62 g/kg de PV)	15,0	mM
Dunlop e Hammond (1965)	15,33 h após a infusão de milho moído (62 g/kg de PV)	17,0	mM
Dunlop e Hammond (1965)	22,00 h após a infusão de milho moído (62 g/kg de PV)	24,0	mM
Dunlop e Hammond (1965)	27,25 h após a infusão de milho moído (62 g/kg de PV)	24,0	mM
<i>Novilhas</i>			
Minami et al. (2021)	Antes da infusão de polpa cítrica para induzir ARSA	0,07	mM
Minami et al. (2021)	3 h após a infusão de polpa cítrica para induzir ARSA	0,42	mM
Minami et al. (2021)	6 h após a infusão de polpa cítrica para induzir ARSA	0,56	mM
Minami et al. (2021)	9 h após a infusão de polpa cítrica para induzir ARSA	0,47	mM
<i>Bezerros</i>			
Gentile et al. (2004)	Animais sem acidose	0,10	mM
Gentile et al. (2004)	Animais com ARSA induzida (1 dia)	1,80	mM
Gentile et al. (2004)	Animais com ARSA induzida (valor máximo)	8,60	mM
Lorenz (2004)	Bezerros com acidose ruminal	5,90	mM
Lorenz (2004)	Bezerros sem acidose ruminal	3,70	mM
Ewaschuk et al. (2003)	Saudável	0,20	mM
Ewaschuk et al. (2003)	Diarreico	10,2	mM
Ewaschuk et al. (2004)	Média-Saudável	1,40	mM
Ewaschuk et al. (2004)	Varição-Saudável	0,80-3,80	mM
Ewaschuk et al. (2004)	Média-Diarreico	13,9	mM
Ewaschuk et al. (2004)	Varição-Diarreico	1,20-22,7	mM
Omole et al. (2001)	Saudável	Não detectado	mM
Omole et al. (2001)	Diarreico	5,20	mM
<i>Ovinos</i>			
Minuti et al. (2014)	Controle	0,07	mM
Minuti et al. (2014)	ARSA induzida (pico com 24 h)	2,68	mM
Huntington e Britton (1979)	90% concentrado + 10% feno	1,30	mg/dL

Como o sangue é o principal veículo de transporte de toxinas e outros produtos da fermentação, a gasometria pode ser um meio útil para detectar o início precoce da patologia (Gianesella et al., 2010). As medidas mais usuais para avaliar o equilíbrio ácido base são pH, pressão parcial de CO<sub>2</sub>, pressão parcial de oxigênio, bicarbonato, CO<sub>2</sub> total (TCO<sub>2</sub>), excesso de bases e intervalo aniônico (diferença entre os eletrólitos carregados negativamente e positivamente) (Russell e Roussel, 2007). O uso de indicadores

sanguíneos, como o excesso de bases ou pH pode ser relevante no diagnóstico de ARSA (Kleen et al., 2003). Devido a absorção de AGV pela parede ruminal, o excesso de bases pode ser reduzido neutralizando os ácidos, portanto, o exame pode revelar uma acidose metabólica compensada (Owens et al., 1998). O excesso de bases normalmente está presente no sangue, mas uma carga de ácidos como na ARSA pode diminuir o excesso de bases e, conseqüentemente, superar a capacidade tampão do bicarbonato (Gianesella et al., 2010). A redução de TCO<sub>2</sub> pode indicar acidose metabólica, enquanto o aumento de TCO<sub>2</sub> pode indicar alcalose metabólica (Russell e Roussel, 2007).

### **5.1 Comprometimento da função de barreira do epitélio do proventrículo**

A utilização de dietas ricas em amido resulta em maior produção de AGV, especialmente propionato e butirato, os quais são descritos como estimuladores do desenvolvimento da mucosa do proventrículo (Vair et al., 1960; Dirksen et al., 1985; Costa et al., 2008; Lima et al., 2015), no entanto, o excesso de butirato pode induzir hiperqueratose, paraqueratose e lesão no epitélio ruminal (Kauffold et al., 1977; Nagaraja and Titgemeyer, 2007).

Uma função crucial do epitélio do proventrículo (rúmen+retículo+omaso), além da absorção de AGV, é manter a integridade da barreira tecidual enquanto regula a absorção de nutrientes (Baldwin, 1998). Vários estudos demonstraram que a barreira epitelial do proventrículo é prejudicada durante longos episódios de acidose (Emmanuel et al., 2007; Steele et al., 2009; Penner et al., 2010). A perda da barreira epitelial do proventrículo durante a acidose pode facilitar a translocação de toxinas e microrganismos para o sangue portal, colonizando o tecido hepático e depois se espalhando para outros tecidos do corpo (Nordlund et al., 1995; Nocek, 1997; Plaizier et al., 2008). Forma-se inicialmente no fígado abscessos hepáticos, causados pela translocação de bactérias ruminais como *Fusobacterium necrophorum* e *Arcanobacterium pyogenes* (Dirksen et al., 1985; Nocek, 1997; Kleen et al., 2003). Essas bactérias podem se espalhar para órgãos como coração, pulmões e rins (Nordlund et al., 1995; Nocek, 1997).

A função da barreira epitelial é particularmente importante em bovinos durante os longos episódios de ARSA, para prevenir a translocação de LPS ou outros compostos tóxicos (i.e., aminas biogênicas) para a circulação sistêmica (Ametaj et al., 2010b). Quando translocado para a circulação sistêmica, os LPS podem induzir a liberação, pelo fígado, de uma variedade de proteínas de fase aguda, como parte de uma resposta inflamatória não específica (Emmanuel et al., 2008; Khafipour et al., 2009c). Apesar de

ser considerada uma reação protetora do corpo, com o objetivo de restabelecer a homeostase perturbada, a longo prazo, estados inflamatórios fortes têm implicações para a saúde do animal (Elsasser et al., 2008; Ametaj et al., 2010a). Em trabalho avaliando diferentes intensidades de acidose, foi verificado que um episódio leve de acidose com, 111 min de pH <5,8, não afetou a função de barreira do epitélio ruminal, mas a acidificação rápida e acentuada, com pH 5,2, aumentou a permeabilidade epitelial (in vitro) (Penner et al., 2010).

Os mecanismos de translocação de compostos tóxicos podem ser favorecidos pelo comprometimento da função de barreira do epitélio ruminal (Emmanuel et al., 2007), esgotamento de fatores de proteção (Hollmann et al., 2013) e aumento da osmolalidade (Owens et al., 1998). A permeabilidade do epitélio ruminal à histamina, outra poliamina associada à alimentação com alta quantidade de grãos (Nocek, 1997), aumentou quando o pH ruminal diminui (Aschenbach et al., 2019). Além disso, a exposição crônica ao etanol pode aumentar a permeabilidade epitelial e a translocação de endotoxina (Enomoto et al., 2001). Curiosamente, ambas as concentrações de endotoxina e etanol no fluido ruminal aumentaram em condições de ARSA, indicando possíveis interações dos compostos gerados, ou seja, etanol, aminas biogênicas e endotoxinas, que potencializam a permeabilidade epitelial das endotoxinas (Plaizier et al., 2018). A ocorrência de inflamação contribui para o declínio da função de barreira do tecido epitelial ruminal, que predispõe à absorção de toxinas (Plaizier et al., 2009).

O processo inflamatório é uma resposta contra traumas, lesões de tecidos ou infecções, através da ativação de uma resposta de fase aguda, a qual inclui a produção de proteínas de fase aguda, como soro amiloide A (SAA) e haptoglobina (Hp) no fígado (Baumann e Gauldie, 1994). A função da resposta de fase aguda é prevenir lesões adicionais, isolar e destruir o organismo infeccioso, remover moléculas e detritos prejudiciais e ativar os processos de reparo necessários para retornar o organismo à função normal (Baumann e Gauldie, 1994).

A proteína SAA contribui diretamente para a neutralização e remoção de determinadas substâncias da circulação através dos hepatócitos (Cabana et al., 1999). A Hp é produzida e liberada pelos hepatócitos durante a translocação bacteriana, sua função primária é ligar a hemoglobina livre do plasma (liberada durante a hemólise dos glóbulos vermelhos) e prevenir a utilização do ferro contido na hemoglobina por bactérias translocadas (Wassell, 2000). Proteína de ligação a LPS (LBP), é outro biomarcador



também usado para indicar inflamação e atua para facilitar a eliminação da endotoxina da circulação sanguínea (Schroedl et al., 2001).

Como SAA e Hp estão entre as proteínas de fase aguda mais reativas em bovinos, suas concentrações no sangue são utilizadas como marcadores inflamatórios em bovinos (Alsemgeest et al., 1994). A maioria dos estudos concordam que a ARSA induzida por grãos causa uma resposta de fase aguda caracterizada por aumentos nas concentrações plasmáticas de SAA, Hp e LBP (Plaizier et al., 2018). Entretanto, as proteínas SAA e Hp não são marcadores de um problema específico e suas concentrações também aumentam durante outras inflamações como mastite e metrite (Baumann e Gauldie, 1994). A inflamação pode estar localizada no epitélio ruminal (ruminite) ou ser sistêmica.

Em meta-análise de Zebeli et al. (2012b), de todas as proteínas de fase aguda plasmáticas testadas como biomarcadores de inflamação, SAA indicou uma resposta de melhor precisão ( $R^2 = 0,46$ ) quando comparada a Hp ( $R^2 = 0,19$ ). Em alguns casos pode ocorrer ausência de aumento da Hp, apesar do aumento da SAA, isso pode ser explicado por diferenças nas citocinas envolvidas no início da síntese dessas proteínas de fase aguda (Jacobsen et al., 2004). Mesmo que as proteínas de fase aguda sejam sintetizadas a partir dos mesmos órgãos (principalmente no fígado), SAA e LBP permanecem na circulação por períodos mais curtos do que Hp. A Hp está principalmente envolvida em condições inflamatórias subclínicas ou crônicas, em vez de agudas (Gabay e Kushner, 1999; Horadagoda et al., 1999).

As relações entre ARSA, endotoxina ruminal e seus efeitos fisiopatológicos resultantes no rúmen e no estado metabólico da vaca foram estudadas em vários trabalhos (Plaizier et al., 2008; Ametaj et al., 2010a), mas os resultados não são conclusivos. Apesar de mudanças terem ocorrido na permeabilidade do epitélio ruminal, a translocação de endotoxina associada a uma inflamação sistêmica não foi relatada em todos os estudos. Isso pode ser devido as diferenças na dieta, concentração de LPS no rúmen, crescimento de bactérias gram-negativas e mudanças adaptativas que ocorrem no epitélio ruminal dependentes da duração e intensidade da ARSA (Emmanuel et al., 2007, 2008; Gozho et al., 2007; Khafipour et al., 2009a, c, 2011; Steele et al., 2009, 2011; Iqbal et al., 2010).

Quando a relação simbiótica ruminal é perturbada (ex. durante a ARSA), mudanças importantes podem ocorrer em seu microbioma e no perfil de metabólitos ruminais, acompanhado de aumento na concentração de LPS (Tajima et al., 2000; Fernando et al., 2010; Hook et al., 2011; Ametaj et al., 2010b). Os LPS são componentes bioativos da parede celular de bactérias gram-negativas (comumente conhecido como endotoxinas) no

trato digestório (Nagaraja et al., 1978; Gozho et al., 2005, 2006b, 2007; Emmanuel et al., 2008; Khafipour et al., 2009c). A concentração de endotoxinas no fluido ruminal aumenta durante a fase de crescimento acelerado e morte massiva de bactérias gram-negativas devido às condições induzidas pela ARSA (Hurley, 1995; Nagaraja et al., 1978). As endotoxinas são moléculas com grande potencial de desencadear processos inflamatórios, as quais consistem em uma região lipídica (denominado lipídeo A) ligada a uma região polissacarídica (Janssens e Beyaert, 2003).

Na meta-análise de Zebeli et al. (2012b) maiores níveis de concentrado na dieta foram associados às concentrações aumentadas de endotoxina ruminal, Hp plasmática e SAA. Redução nos níveis de FDN na dieta resultou em maiores concentrações de LPS e SAA no plasma, mas as relações entre estas variáveis não foram lineares. Baixo pH ruminal e a duração do pH ruminal <6,0 foram associados ao aumento das concentrações de endotoxina no fluido ruminal, embora isso nem sempre esteve associado à inflamação sistêmica. A concentração de SAA no plasma foi melhor explicada pelo nível de concentrado na dieta do que pelas variáveis de pH ruminal (Zebeli et al., 2012b). A gravidade da acidose (baixo pH ruminal e longa duração) e altas concentrações de endotoxina no fluido ruminal nem sempre resultam na inflamação sistêmica, pois o pH ruminal explicou apenas 15 a 21% da variação nas respostas do SAA plasmático, indicando que outros fatores, além do pH ruminal, são importantes para induzir uma inflamação sistêmica em bovinos (Zebeli et al., 2012b). Embora a endotoxina seja frequentemente usada como marcador para a liberação de compostos tóxicos durante a acidose, outras toxinas, como as aminas biogênicas, metilamina e nitrosodimetilamina (Plaizier et al., 2008; Ametaj et al., 2010a), também se tornam mais abundantes no ambiente ruminal em acidose.

Quanto mais tempo o pH ruminal permaneceu abaixo de 6,0, maior foi a concentração de endotoxina no fluido ruminal (Zebeli et al., 2012b). Nesse mesmo experimento foi observado correlação negativa entre o pH ruminal médio diário e a concentração de SAA. O mesmo estudo indicou a presença de concentração basal de endotoxina no fluido ruminal (3,6 - 3,9 log EU/mL), independente da dieta ou da gravidade da acidose ruminal. O aumento no nível de LPS ruminal inicia-se antes de aumentar a concentração plasmática de SAA, ou seja, maior nível de concentrado ou menor teor de FDN na dieta são necessários para aumentar SAA plasmática, em comparação com as concentrações dietéticas necessárias para aumentar o nível de endotoxina ruminal. Esses dados indicam que os bovinos podem tolerar o aumento de um

certo nível de endotoxina ruminal no fluido ruminal antes que ocorra a ativação da inflamação sistêmica (Zebeli et al., 2012b).

Nos episódios de ARSA, grandes quantidades de substratos fermentáveis podem escapar da fermentação ruminal e chegar aos intestinos (Plaizier et al., 2018). Os substratos não digeridos no intestino delgado, principalmente amido, são fermentados no intestino grosso, aumentando o risco de acidose no ceco-cólon (Plaizier et al., 2018). Evidências sugerem que a acidose intestinal pode afetar o estado de saúde dos bovinos da mesma forma que a acidose ruminal (Gressley et al., 2011; Steele et al., 2016).

A diarreia tem sido associada à ARSA em rebanhos leiteiros (Nocek, 1997; Kleen et al., 2003; Oetzel, 2003), sendo que a fermentação intestinal extensa pode contribuir para a diarreia, pois, a consistência fecal é determinada pelo fluxo da água no trato digestório quando a digesta se torna hipertônica em comparação ao plasma sanguíneo (Huber, 1976; Plaizier et al., 2009). Os AGV produzidos no ceco-cólon podem ser absorvidos, mas a proteína microbiana é excretada e o gás produzido aparece como bolhas nas fezes, dando-lhes uma aparência "espumosa" (Plaizier et al., 2009). Fezes espumosas e diarreia sugerem extensa fermentação intestinal que também foi associada com ARSA (Nordlund et al., 2004).

Os valores de pH apresentados anteriormente como limites de ARSA no rúmen (e.g.,  $\cong 5,8$ ) são mais baixos do que limites de acidose no intestino grosso (normalmente na faixa de 6,0 a 6,6; Metzler-Zebeli et al., 2013). A estrutura histológica mais simples do que o proventrículo, torna o epitélio do intestino grosso mais suscetível ao dano ácido, dano à barreira e translocações de toxinas do que o proventrículo (Li et al., 2012; Tao et al., 2014).

Maior translocação de endotoxina através do epitélio do ceco-cólon em comparação com o epitélio do rúmen foi observado por Emmanuel et al. (2007), isso porque a concentração de endotoxina no intestino grosso pode exceder os valores registrados no proventrículo dos mesmos indivíduos (Li et al., 2012; Metzler-Zebeli et al., 2013). Portanto, vários sintomas atribuídos ao ambiente ruminal podem ser o resultado de condições adversas no intestino grosso (Plaizier et al., 2018), pois, a disbiose microbiana e o dano epitelial no intestino grosso podem levar à translocação sistêmica de toxinas e bactérias, resultando em sintomas semelhantes aos da ARSA (Plaizier et al., 2008; Zebeli et al., 2012b). Altas concentrações de LPS no intestino grosso podem representar maior risco à saúde do animal do que LPS alto no proventrículo (Plaizier et al., 2018).

Khafipour et al. (2009a) chamam a atenção para as diferenças existentes entre o epitélio do rúmen, do intestino delgado e do intestino grosso, podendo resultar em diferenças no efeito do LPS na função de barreira do epitélio entre essas partes do trato gastrointestinal (TGI). O epitélio intestinal possui estrutura simples de monocamada com junções apertadas no polo apical das células, enquanto isso, o epitélio ruminal tem estrutura multicamada com junções apertadas (Graham e Simmons, 2005), dificultando o rompimento da função de barreira no rúmen. Caso as endotoxinas não sejam translocadas do rúmen para a corrente sanguínea, seguem pelo trato gastrintestinal até atingirem os intestinos delgado e grosso (Khafipour et al., 2009a), mas serão destoxificado no duodeno, principalmente pelos ácidos biliares (Bertok, 1998). Logo, a principal fonte de LPS no intestino grosso é proveniente dos microrganismos na fase final do intestino delgado ou do próprio intestino grosso. Se esta hipótese estiver correta ou parcialmente correta, então a taxa de translocação de LPS e sua concentração periférica são menos dependentes do ambiente ruminal, mas altamente influenciada pela chegada de amido aos intestinos e que estimula a liberação de LPS na porção final do íleo e no intestino grosso (Khafipour et al., 2009a).

## **6. Controle da acidose ruminal**

Os efeitos da ARSA induzida por alimentação com alto teor de grãos são mais graves do que quando induzida por alimentação com baixo teor de FDN<sub>fe</sub> (Khafipour et al., 2009a,b). Níveis mais elevados de CMS podem predispor à ARSA, devido ao maior fluxo ruminal de AGV em relação à capacidade de tamponamento (Stone, 2004). Apesar da maior taxa fracional de passagem, causada pelo aumento no CMS, reduziu a digestibilidade ruminal do amido, o aumento do CMS frequentemente proporciona maior quantidade de amido degradável no rúmen (Firkins, 2002).

Em meta-análise de Khorrami et al. (2021), foram encontrados mais casos de ARSA quando o teor de amido foi superior a 20% e o teor de FDN<sub>fe>8</sub> foi inferior a 14%. As regressões obtidas a partir dos dados avaliados pelos autores sugerem como meta 15 a 18% de FDN<sub>fe>8</sub> como uma faixa mais segura para formulação de dietas para prevenir ARSA, quando as dietas contêm 20 a 25% de amido.

Outra forma possível para ajustar a forma física das dietas e atingir valores seguros de pH ruminal é por meio do sistema de FDN fisicamente ajustado (FDN<sub>fa</sub>) proposto por White et al. (2017a, b) e adotado recentemente pelo NASEM (2021). Este sistema recomenda proporções de partículas na peneira de 8 mm do PSPS, a partir da proporção

retida na peneira de 19 mm e outras características da dieta tais como FDN, FDNf, amido e proporção de forragem na dieta. Embora o sistema de FDNfa considere maior efetividade de partículas >19 mm comparativamente às partículas com 8-19 mm, a substituição dietética de partículas com comprimento mediano por partículas longas (>19 mm) não é capaz de induzir aumento consistente no tempo de ruminação (Beauchemin et al., 2003); enquanto no modelo de FDNfa apenas o tempo de ruminação (min/kg MS) (mas não o tempo de ingestão) foi significativamente relacionado com pH ruminal. Provavelmente isso ocorra pelo tamanho de partículas deglutidas pelos animais (normalmente <11 mm; vide discussão anterior). Também, o fator de efetividade de cada fração (>19 mm ou 8-19 mm) varia conforme a proporção de RTM retida na peneira de 19 mm ou quando há variação nos teores de amido e FDNf da dieta (Tabela 3). Ainda, apesar da exigência de fibra efetiva depender da capacidade acidogênica da dieta, o modelo não considera diferenças em fermentabilidade ruminal do amido (e.g., milho moído seco vs. silagem de grão úmido), mas apenas o teor total de amido. Por fim, os cenários com recomendações de proporções elevadas de partículas retidas na peneira de 19 mm devem ser interpretados com cautela, pois o modelo não considera a possibilidade de seleção de partículas no cocho.

**Tabela 3.** Recomendações de retenção mínima de MS dietética na peneira de 8 mm do PSPS conforme retenção de MS na peneira de 19 mm para manter pH ruminal médio  $\geq 6$  em vacas em lactação alimentadas com RTM

Composição da RTM (% MS)				Manter pH 6,0			Manter pH 6,1		
				% RTM na peneira de 19 mm			% RTM na peneira de 19 mm		
Forragem	Amido	FDN	FDNf	3	9	15	3	9	15
				Mínimo na peneira de 8 mm (%)			Mínimo na peneira de 8 mm (%)		
40	35	25	19	20	13	12	53	43	33
40	30	28	19	26	17	14	53	42	33
40	25	30	22				17	10	11
40	25	30	19	19	12	11	36	26	19
40	25	30	17	32	23	17	50	40	31
40	20	33	17	11	10	10	19	12	11
40	20	33	15	24	15	12	32	22	16
40	20	33	14	30	21	15	39	29	21
40	15	35	13				17	10	10
50	35	25	20	25	17	13	40	30	22
50	35	25	18	40	31	23	59	48	38
50	30	28	22	12	10	10	23	14	12
50	30	28	20	26	17	13	38	28	20
50	30	28	18	41	31	23	54	44	34
50	25	30	22				17	10	10
50	25	30	20				31	22	15
50	25	30	18	24	15	12	46	36	27
50	20	33	19				18	10	10
50	20	33	17				32	22	16
60	30	28	23				42	32	23
60	30	28	22				51	41	31
60	25	30	24				22	13	10
60	25	30	23				30	20	14
60	25	30	22				38	28	19
60	20	33	20				26	17	12

Fonte: NASEM (2021).

Espaços sem preenchimento correspondem aos cenários aonde o pH 6,0 foi predito em qualquer uma das combinações possíveis; portanto, não há valor mínimo para a peneira de 8 mm.

## 7. Exigências de fibra para vacas leiteiras

O termo ‘fibra’ deve ser considerado um termo apenas nutricional e está vinculado ao método analítico empregado em sua determinação (Mertens, 2002b). Para ruminantes, a fibra pode ser definida como a matéria orgânica de digestão lenta ou indigestível de um alimento ou dieta que ocupa espaço no rúmen (Mertens, 1997).

As primeiras estratégias de alimentação de rebanhos leiteiros surgiram de situações em que a forragem era o principal ingrediente da dieta e, em tais condições a fibra não era limitante (Armentano e Pereira, 1997). Com o passar de décadas, os rebanhos leiteiros

se tornaram especializados em produzir leite e, aliado a esse fato, as exigências nutricionais também mudaram (Humer, et al., 2018; Beauchemin, 2018). Dietas de vacas leiteiras de alta produção normalmente contêm proporções elevadas de carboidratos não fibrosos e baixos teores de fibra, para atender a alta demanda de nutrientes durante a lactação. No entanto, a ocorrência de falhas em manter o balanço adequado de fibra na dieta contribui para a ocorrência de acidose ruminal (Zebeli et al., 2012a).

O NRC (1978) recomendava no mínimo de 17% de FB ou 21% de FDA na dieta de vacas leiteiras em lactação, independentemente do estágio da lactação. Já o NRC (1989) recomendou valores mais baixos de fibra do que a edição anterior, sendo 15% de FB, 19% de FDA e 25% de FDN para vacas no pico de produção, visto que os níveis indicados pela edição de 1978 eram difíceis de ser alcançados para vacas leiteiras de alta produção no início da lactação, as quais necessitavam de altas quantidades de energia e proteína, mas com consumo baixo (Kawas et al., 1991).

Balch (1971) propôs uma razão de ruminação ou índice de volumoso para alimentos, baseado no fato de que as propriedades físicas da dieta influenciavam o tempo de mastigação. O índice de volumoso foi expresso em minutos de mastigação por quilograma de MS da dieta, pois, quando o tempo total de mastigação é expresso dessa forma, a influência da variação de ingestão de alimentos é amplamente evitada (Balch, 1971). Sudweeks et al. (1981) desenvolveram uma equação para prever o índice de volumoso, para isso era necessário conhecer algumas características do material como, teor de FDN, tamanho de partículas (como diâmetro médio em milímetros) e CMS. Santini et al. (1983) descrevem uma equação para calcular o índice de volumoso com base em um experimento que testou diferentes tamanhos de partículas. Uma desvantagem de usar índice de volumoso é que ele muda não apenas com a qualidade da forragem, matéria seca total e consumo de forragem, mas também com o comprimento das partículas (Santini et al., 1983).

Por muito tempo era comum as dietas expressarem seus níveis de fibra por meio da razão volumoso:concentrado (V:C). O surgimento desse conceito possivelmente estava associado aos experimentos que testavam diferentes razões V:C no desenvolvimento de RTM para vacas leiteiras alimentadas em grupo. A razão V:C era usada como um indicativo do teor de fibras e energia da RTM de vacas em lactação (Coppock et al., 1972, 1974; Hernandez-Urdaneta et al., 1976; Keys et al., 1983). No entanto, esse índice apresenta problemas, pois, manter a mesma razão V:C e trocar a fonte de forragem

produzem respostas distintas, pois há diferenças no teor e na efetividade física da fibra entre as diversas fontes.

### **7.1. Recomendações com base no teor de FDN**

A FDN é constituída por componentes da parede celular vegetal, correspondendo principalmente à celulose, hemicelulose e lignina (Van Soest, 1994). Em geral, a FDN corresponde a fração de digestão lenta associada ao enchimento ruminal e à limitação de CMS. Apesar da FDN representar quimicamente o teor total de fibra para ruminantes, ela não mede as propriedades físicas, como o tamanho das partículas (FDN menos efetiva quando forragens finamente picadas ou fontes de fibra de subprodutos são usadas), que influenciam a efetividade da fibra para atender as exigências mínimas de ruminantes (Mertens, 2002b). Mertens ainda afirmou: “quando a maior parte da fibra nas rações for proveniente de forragens longas ou cortadas grosseiramente, a concentração de FDN pode ser usada para formular rações para atender às necessidades mínimas de fibra”. Além disso, a FDN não é uma fração nutricionalmente uniforme, pois sua digestibilidade varia amplamente de acordo com a fonte.

O NRC (1989) recomenda valores mínimos de 25% de FDN em dietas de vacas de leite para manter um ambiente ruminal saudável e ao menos 19% da FDN de forragem (com base na MS da dieta). No entanto, essas recomendações são para situações muito específicas (dietas que contenham forragem com tamanho de partícula adequado, grão de milho seco como fonte de amido predominante e fornecimento na forma de RTM).

As forragens picadas grosseiramente fornecem FDN de uma forma física muito diferente do que fontes de FDN de subprodutos e grãos. A partir daí o conselho do NRC (2001) assumiu que a efetividade da FDN de fontes não forragem é 50% da efetividade da FDN de forragem. Sendo assim, para redução de 1 unidade percentual no FDN da forragem (% MS da dieta) abaixo de 19%, a concentração de FDN da dieta total deve ser aumentada em 2 unidades percentuais (NRC, 2001).

A análise de FDN de forragens e outros ingredientes fornece uma descrição útil sobre o teor total de fibra, mas utilizar o teor de FDN como única medida de fibra efetiva provou ser insuficiente para diferentes classes de alimentos (e.g., subprodutos com alto teor de fibras, forragens processadas em diferentes formas físicas). Portanto, fatores de ajuste devem ser atribuídos a esses alimentos se as exigências de fibra forem usadas para balancear a fração de carboidratos das dietas de vacas em lactação (Armentano e Pereira, 1997).



## **7.2. Recomendações com base no teor de FDN de forragem (FDNF)**

O comitê do NASEM (2021) recomenda a FDNF como consideração primária para a formulação de dietas, em vez da FDN total, assim como estabeleceu as edições anteriores do NRC (1988; 2001). Em trabalho de Allen (1997) foi constatado que o pH ruminal apresentou relação positiva com a FDNF (% MS), devido a capacidade da FDNF estimular mastigação e aumentar a motilidade ruminal. A FDNF mínima provavelmente varia de 15 a 19% da MS da dieta, já o teor de FDNF ideal para vacas em lactação provavelmente varia de 17 a 27% da MS da dieta, sendo que a concentração ótima de FDNF de dietas para maximizar a ingestão de energia é maior do que o mínimo para reduzir o risco de acidose (Allen, 1997; NASEM, 2021). A fermentabilidade da dieta é um fator que influencia a concentração ideal de FDNF na ração (Allen, 1997). No modelo do NASEM (2021), a fermentabilidade da dieta é indicada indiretamente pelo teor de amido.

## **7.3. FDN efetiva (FDNe)**

Existem diversas formas de medir a efetividade da fibra, o que resulta em valores distintos de efetividade. Por exemplo, a capacidade da FDN de fontes de fibra não forragem (FFNF) de manter a gordura do leite é maior do que a capacidade de estimular a mastigação (Swain e Armentano, 1994).

A definição de FDNe está relacionado à capacidade total de um alimento para substituir forragem ou volumoso em uma ração, de modo que o percentual de gordura no leite produzido pelas vacas que comem a dieta seja efetivamente mantido (Mertens, 1997). A FDN dos subprodutos ricos em fibras não é tão efetiva quanto a FDN da forragem em manter a gordura do leite (Armentano e Pereira, 1997), com exceção do caroço de algodão, onde o fator de efetividade de FDN em relação à FDN de forragem é próximo de 1 (Clark e Armentano, 1993).

Utilizar apenas FDNe como medida de fibra efetiva pode trazer riscos aos animais, pois é mais fácil um ingrediente manter gordura do leite do que manter o tempo de mastigação (Swain e Armentano, 1994). Logo, na maioria das dietas não vai faltar FDNe, mas muitas vezes está faltando efetividade física, o que prejudica a saúde e a longevidade das vacas. Quando baseadas na gordura do leite em comparação com a mastigação, maiores fatores de efetividade foram verificados em vários experimentos (vide Tabela 5 no tópico Métodos biológicos para determinar a efetividade da fibra).

#### 7.4. FDN fisicamente efetiva (FDNfe)

A efetividade física de um alimento está relacionada às características físicas e químicas da fibra (e.g. tamanho de partículas, densidade, fragilidade, umidade e digestibilidade), que influenciam a atividade mastigatória, a consistência do *mat* ruminal (i.e., camada de fibra longa no rúmen) e a motilidade ruminal (Armentano e Pereira, 1997; Mertens, 1997).

Matematicamente, o teor de FDNfe é o produto do fef pelo conteúdo de FDN do alimento (i.e.,  $FDNfe = fef \times FDN$ ; Armentano e Pereira, 1997). Enquanto, o teor de FDN é determinado por análise química, o fef pode ser mensurado a partir de respostas fisiológicas dos animais, também conhecidos como ensaios biológicos (Armentano e Pereira, 1997) ou por métodos laboratoriais, com base nas frações do alimento retidas em um conjunto de peneiras (Lammers et al., 1996; Mertens, 1997; Heinrichs, 2013). O fef por definição varia de 0, quando o FDN não possui efetividade física (exemplo, fibra de concentrados), a 1, quando o FDN é totalmente efetivo (exemplo, fibra de feno) na promoção da estratificação da digesta no rúmen, na atividade mastigatória e no tamponamento do rúmen (Allen, 1997; Mertens, 1997). Entretanto, o fef pode ser maior do que 1, dependendo da fonte de FDN utilizada como padrão nos bioensaios (Sá Neto et al., 2014).

O atendimento das exigências mínimas de FDNfe é necessário para estimular a atividade de mastigação e produção de saliva, promover a formação do *mat* ruminal e estimular a motilidade ruminal. Isso favorece a remoção de ácidos produzidos durante a fermentação ruminal e contribui para a manutenção do pH ruminal dentro da normalidade fisiológica, possibilitando o funcionamento adequado do ambiente ruminal (Allen, 1997; Zebeli et al., 2012a; Humer, et al., 2018). Por outro lado, embora níveis mínimos de FDNfe na dieta seja importante para reduzir o risco de acidose ruminal, quantidades excessivas podem limitar o CMS e o desempenho animal (Allen, 1997).

Mertens (1997) sugeriu que era importante desenvolver um novo sistema de exigência de fibra para vacas leiteiras, e este deveria envolver as características (físicas e químicas) do ingrediente em associação com determinações quantitativas (teor de FDN e retenção de partículas na peneira de 1,18 mm) que pudessem ser feitas rotineiramente nos laboratórios. O sistema proposto por Mertens (usando amostras secas em estufa e agitação vertical num conjunto de peneiras de laboratório) sugeriu que as partículas retidas acima de uma peneira de 1,18 mm favoreciam a mastigação. Assim, o teor de FDNfe poderia ser estimado integrando características químicas e físicas determinadas em laboratório,

sendo calculado pelo produto do teor de FDN do ingrediente e a proporção de partículas >1,18 mm. A estratificação usando a peneira de 1,18 mm foi definida a partir do trabalho de Poppi et al. (1980) com ovinos, em que parte pequena de partículas maiores que 1,18 mm saíram do ruminorretículo, mas para bovinos leiteiros esse tamanho de partículas parece não ser o mais adequado. Outro fator a ser considerado é que o método parte do pressuposto que o teor de FDN é uniformemente distribuído entre todas as partículas do alimento testado, que todas as partículas >1,18 mm induzem a mesma atividade mastigatória e que as diferentes fontes de FDN apresentam a mesma fragilidade (i.e., facilidade de cominuição; Mertens, 1997).

O PSPS é um dispositivo operado manualmente que foi amplamente adotado nas fazendas para caracterizar o tamanho de partículas de forragens e RTM. Inicialmente, o conjunto foi proposto com duas peneiras (19 e 8 mm) e o fundo, mas atualmente o conjunto contém 3 peneiras (19, 8 e 4 mm) e o fundo (Heinrichs, 2013), mas em um momento chegou a ter uma peneira de 1,18 mm no lugar da peneira de 4 mm (Kononoff et al., 2003). Desde a sua introdução em 1996, o separador tem sido usado para avaliar os efeitos do tamanho de partículas da RTM sobre produção e composição do leite, atividade mastigatória e fermentação ruminal (White et al., 2017a).

Em meta-análise de Zebeli et al. (2012a) chegou-se as recomendações de  $FDN_{fe>1,18}$  de 31,2%, e  $FDN_{fe>8}$  variando de 14,8% a 18,5% (%MS), sendo que valores acima de 18,5% são considerados mais seguros em termos de ocorrência de acidose, no entanto, valores acima de 14,9% da MS da dieta já podem diminuir o nível de CMS (Zebeli et al., 2012a). A  $FDN_{fe}$  na dieta consumida pode ser afetada pela seleção de partículas no cocho, a qual aumenta com o excesso de partículas longas, principalmente em dietas mais secas (Leonardi e Armentano, 2003). Por esse motivo, a  $FDN_{fe}$  deve ser encarado como um intervalo ideal a ser atingido, em vez de um mínimo que pode ser excedido sem consequências negativas (NASEM, 2021).

Mesmo que o conceito de  $FDN_{fe}$  englobe propriedades físicas e químicas, a expressão e caracterização do tamanho de partícula da forragem ou da RTM é difícil. Utilizar forragens com partículas grandes na dieta ofertada não significa necessariamente que na dieta consumida ainda contenha partículas grandes (Zebeli et al., 2012a). Além do teor de FDN e do tamanho das partículas, as características inerentes à natureza da fibra afetam a efetividade da FDN. Aumentando o nível de silagem de cana na dieta, em detrimento da silagem de milho, com distribuição semelhante de partículas no PSPS, a silagem de cana teve maior capacidade de estimular a ruminação por unidade de FDN (Sá

Neto et al., 2014). Tal diferença foi atribuída ao maior conteúdo de FDN indigestível da silagem de cana, o qual é indicativo de baixa digestibilidade da fibra. Assim, as fibras de forragens menos digestíveis ocasionam aumento no tempo de ruminação por quilograma de MS e FDN consumidos.

O conceito de FDNfe não leva em consideração as diferenças na fermentabilidade ruminal dos ingredientes da dieta e isso limita a capacidade de fornecer recomendações isoladas de FDNfe (Zebeli, et al., 2012a). Por exemplo, as respostas dos animais podem ser totalmente diferentes quando cevada em vez de milho é fornecida às vacas, mesmo que a dieta contenha o mesmo teor de FDNfe (Khorasani et al., 2001; Zebeli et al., 2006). No geral, balancear o fornecimento de FDNfe e a quantidade de nutrientes fermentescíveis (principalmente amido degradável no rúmen) é fundamental para manter o ambiente ruminal saudável e ainda garantir o máximo desempenho e eficiência alimentar (Humer et al., 2018).

### **7.5. FDN fisicamente ajustada (FDNfa)**

Recentemente, o comitê do NASEM (2021) adotou o conceito de FDN fisicamente ajustado (FDNfa) (White et al., 2017a,b). O sistema foi elaborado para fornecer orientação sobre os requisitos de tamanho de partícula da dieta para atingir um alvo de pH ruminal e sua interação com outros componentes da dieta, como concentrações de amido e FDN na dieta, FDN de forragem e razão FDA:FDN. Esses componentes são utilizados pois foram identificadas como variáveis explicativas no modelo (White et al., 2017b).

A FDNfa não tenta prever pH ruminal, mas demonstrar como a composição química e a forma física da dieta afetam o pH ruminal (White et al., 2017a,b; NASEM, 2021). O sistema de FDNfa: 1) apresenta resultados mais confiáveis quando o alvo de pH ruminal está entre 6,0 e 6,1; 2) foi desenvolvido principalmente com dados de animais alimentados individualmente, portanto, não refletem o maior potencial de seleção de partículas da RTM em comparação com fazendas comerciais ou condições de superlotação que limitam o espaço de cocho; e 3) para dietas com alto teor de forragem (ex. dietas para vacas secas) o sistema FDNfa não é muito útil (NASEM, 2021). Aparentemente este modelo superenfatica a efetividade de partículas >19 mm e desconsidera a fermentabilidade ruminal do amido (vide discussão anterior no tópico “Controle da acidose ruminal”).

### 7.6. FDN indigestível fisicamente efetiva (FDNife)

Esse conceito foi estabelecido recentemente pelo grupo de pesquisa do William H. Miner Agricultural Research Institute (Chazy, NY, USA). Pode ser calculado simplesmente como o fef multiplicado pelo teor de FDNi obtido como a porcentagem de FDN que não é degradada após 240 horas de incubação *in vitro* (FDNi; Smith et al., 2020; Miller et al., 2020, 2021). O fef se refere à fração retida em uma peneira de 1,18 mm quando seca e com peneiramento vertical (Mertens, 1997) ou usando uma peneira de 4,0 mm com peneirando horizontal e amostras úmidas (Heinrichs, 2013). O conceito de FDNife ainda está em desenvolvimento, mas uma faixa de 4,5 a 6% da MS da dieta parece ser uma meta para vacas de alta produção alimentadas com dietas à base de silagem de milho (Smith et al., 2020).

Além de englobar as características físicas (tamanho) essa metodologia também utiliza a FDNi, a qual é um indicador de indigestibilidade dos ingredientes e demonstra o potencial de enchimento ruminal e retenção de partículas, com influência no CMS. Contemplar a fração FDNi preenche um vazio conceitual na FDNife, pois pode ser um indicador da resistência que as partículas apresentam para reduzir de tamanho e sair do rúmen.

A digestibilidade e indigestibilidade da fibra são fatores críticos na avaliação da qualidade da forragem e na formulação de dietas (Cotanch et al., 2014). Tradicionalmente, os nutricionistas se concentraram principalmente nas medidas de digestibilidade da fibra, mas recentemente o foco também incluiu a fibra indigestível, devido ao reconhecimento de sua importância em definir a extensão e influenciar as taxas de fermentação da fibra no rúmen (Cotanch et al., 2014).

Para as partículas saírem do rúmen há duas maneiras, por degradação ou passagem. Para a FDNi, a única forma de deixar o rúmen é por passagem. A FDNi é importante biologicamente porque: é a fração de fibra funcional que influencia a efetividade física, o preenchimento intestinal e a dinâmica de digestão/passagem das forragens; prediz a qualidade da forragem devido à relação entre a FDNi e a digestibilidade da MO; desempenha um papel crítico na manutenção do volume de digesta ruminal; e a resposta mastigatória ao FDNife é provavelmente influenciada pelo FDNi da forragem (Nousiainen et al., 2003; Cotanch et al., 2014; Sá Neto et al., 2014).

O espaço ruminal resultante da renovação da fibra de rápida e de lenta degradação e da FDNi permite maior CMS. Quanto mais rapidamente o espaço ruminal for disponibilizado (maior taxa fracional de passagem), maior será a ingestão que pode ser

atingida. O pool total de FDNi no rúmen pode ser considerado como um ponto de referência de preenchimento, que restringe o possível fluxo de FDN. Propõe-se que haja uma quantidade máxima e mínima de FDNi ruminal para evitar limitação no consumo de ração e para manter a saúde ruminal adequada, respectivamente (Cotanch et al., 2014). Em experimento à base de silagem de milho, o aumento do teor de FDNi de 8,9 para 11,5 promoveu uma redução no CMS para vacas em lactação (Smith et al., 2018).

As partículas da fração forragem são as principais responsáveis para definir as características do *mat* ruminal, as quais apresentam quantidades consideráveis de FDNi. Portanto, além da fração FDNi da forragem não contribuir como substratos para a fermentação e não gerar ácidos, ela tem função importante associada à formação do *mat* ruminal.

Em experimento avaliando dietas com dois níveis do fator FDNi (8,9 e 11,5% MS) e dois níveis do fator FDNfe (alto e baixo), ajustadas com feno de tamanhos de corte diferentes, a dieta rica em FDNi e rica em FDNfe limitou o CMS (Tabela 4) em comparação com as demais dietas, mas, um comprimento de corte mais curto para a dieta com maior FDNi aumentou o CMS em 2,5 kg/d (Grant et al., 2018). A dieta mais rica em FDNi, quando picada mais finamente promoveu o maior consumo de FDNi em % do PV (0,45).

**Tabela 4.** Consumo de matéria seca e fibra para vacas alimentadas com diferenças dietéticas em FDNi e FDNfe

Item	Baixo FDNi <sup>1</sup>		Alto FDNi		EPM	P-valor
	Baixo FDNfe <sup>2</sup>	Alto FDNfe	Baixo FDNfe	Alto FDNfe		
CMS, kg/d	27,5 <sup>a</sup>	27,3 <sup>a</sup>	27,4 <sup>a</sup>	24,9 <sup>b</sup>	0,6	<0,01
CMS, % PV	4,02 <sup>a</sup>	4,04 <sup>a</sup>	3,99 <sup>a</sup>	3,73 <sup>b</sup>	0,10	0,03
Ingestão de FDN, kg/d	9,12 <sup>b</sup>	9,06 <sup>b</sup>	9,74 <sup>a</sup>	8,96 <sup>b</sup>	0,19	<0,01
Ingestão de FDNi, kg/d	2,41 <sup>c</sup>	2,43 <sup>c</sup>	3,11 <sup>a</sup>	2,87 <sup>b</sup>	0,05	<0,01
Ingestão de FDNi, % PV	0,35 <sup>c</sup>	0,36 <sup>c</sup>	0,45 <sup>a</sup>	0,43 <sup>b</sup>	0,01	<0,01
Ingestão de FDNfe, kg/d	5,56 <sup>b</sup>	5,94 <sup>a</sup>	5,07 <sup>c</sup>	5,44 <sup>b</sup>	0,11	<0,01
Ingestão de FDNife, kg/d <sup>3</sup>	1,47 <sup>c</sup>	1,59 <sup>b</sup>	1,61 <sup>b</sup>	1,74 <sup>a</sup>	0,03	<0,01

Fonte: Grant et al. (2018).

<sup>abc</sup>Médias na mesma linha com letras diferentes diferem ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>1</sup>FDN não digerido em 240 h de fermentação in vitro.

<sup>2</sup>FDN fisicamente efetiva.

<sup>3</sup>FDN indigestível fisicamente efetiva (fef x FDNi).

Alterando o teor de FDNi ou tamanho de partículas (FDNfe) mas mantendo o mesmo FDNife obteve-se a mesma resposta de CMS pelas vacas (Grant et al., 2018). Há

anos, os nutricionistas utilizam a picagem de forragens de baixa qualidade para aumentar o consumo de MS. De acordo com Moser (1980), o feno pode ser moído para aumentar o consumo de forragem de baixa qualidade, para reduzir a rejeição de partes da planta ou para possibilitar a mistura de uma ração. O autor destaca que esse processamento melhora o consumo devido à menor retenção no rumen, reduzindo o efeito de enchimento e a regulação física do consumo devido à baixa digestibilidade.

Maior inclusão de forragem, maior teor de FDN, maior teor de FDNfe e (ou) menor digestibilidade de FDN podem aumentar o tempo gasto de ingestão para uma ampla gama de forragens (Grant e Ferraretto, 2018). No experimento acima, as vacas alimentadas com dieta alta em FDNi e alta em FDNfe gastaram 45 min/d a mais comendo e, ainda assim, consumiram menos ( $\approx 3$  kg/d a menos de MS). Os autores ainda questionam se as vacas teriam ou não tempo suficiente para passar no cocho comendo uma dieta com mais FDNi que é picado muito grosseiramente. E essa situação pode se agravar em ambientes com superlotação, nesse caso a restrição no tempo de alimentação pode ser ainda mais prejudicial (Grant et al., 2018).

Parte da razão pela qual o tempo de alimentação foi mais afetado do que o tempo de ruminação, se explica pelo comportamento que as vacas tendem a mastigar o bolo alimentar até atingir tamanho de partícula relativamente uniforme antes de engolir. No experimento de Schadt et al. (2012), avaliou-se o tamanho de partículas de diversos alimentos antes e após serem deglutidos. Constatou-se que independentemente do tamanho inicial de partículas, os bovinos mastigavam até que o bolo tivesse em média 10 a 11 mm para ser deglutido. No experimento reportado por Grant et al. (2018), independentemente do teor de FDNi e FDNfe na dieta, as partículas foram engolidas com um tamanho médio de aproximadamente 7 a 8 mm (Grant et al., 2018).

Com um banco de dados de 5 trabalhos realizados com vacas holandesas, a equipe do Miner Institute avaliou a relação entre FDNi e FDNife com CMS e produção de leite corrigido para energia (LCE) (Miller et al., 2020). Verificou-se que o teor de FDNi na dieta variou de 5,5 a 11,5% da MS e FDNife na faixa de 4,0 a 7,3% da MS. Segundo os autores esta faixa de FDNi abrange o que é comumente encontrado nas dietas americanas, com valores de 10,0 a 11,5%, sendo que estes valores são mais propensos a limitar o CMS. Já valores próximos de 5 a 6% de FDNi, aumentam o risco de ARSA. A partir da análise de dados, identificou-se relação moderada entre FDNi e CMS ( $R^2 = 0,32$ ), mas quando FDNi foi combinado com fe (FDNife) a relação entre FDNife e CMS foi mais alta ( $R^2 = 0,60$ ). A relação entre FDNi e LCE foi razoável ( $R^2 = 0,58$ ), mas a relação entre

FDNife e LCE foi ainda mais forte ( $R^2 = 0,78$ ) (Miller et al., 2020). Estes dados demonstram que quando o FDNi é associado com tamanho de partículas, o poder de predição de CMS e LCE é maior do que quando comparado apenas ao FDNi.

As pesquisas até o momento sugerem que, quando a digestibilidade da fibra da forragem é menor do que o desejado, um tamanho de partícula de forragem mais fino aumentará a produção de LCE e CMS (Grant et al., 2018). O maior desempenho parece estar associado ao menor tempo de ingestão e uma fermentação ruminal mais desejável (Grant et al., 2018; Smith et al., 2020). Picar a forragem mais fina ajuda a reduzir o valor de FDNife, pois diminui o fef e reduz o impacto de preenchimento ruminal pelo material menos digestível (Serva et al., 2021).

O problema associado ao fato de ignorar o tamanho das partículas pode ser mais visível em dietas com excesso ou falta de FDNi. A forragem com baixo teor de FDNi não deve ser cortada muito fina, pois as vacas ainda precisam de FDNfe (Smith et al., 2020). Já para forrageiras com alta FDNi, a estratégia para que o CMS não seja comprometido é reduzir o tamanho de partículas, como demonstrado no trabalho de Grant et al. (2018).

## **8. Métodos de avaliação do fator de efetividade de fibra**

### **8.1. Métodos laboratoriais**

Existem vários sistemas atualmente para medir o tamanho das partículas e ainda vários métodos para usar os dados do tamanho das partículas para calcular a FDNfe nas rações (Maulfair e Heinrichs, 2012). Como não existe um método padrão, vários sistemas diferentes estão sendo usados, e às vezes seus dados são usados indistintamente, embora seus resultados possam não ser comparáveis. Muitos dos sistemas que tentam estimar a FDNfe são baseados na teoria de que há um limite de tamanho crítico para as partículas que saem do rúmen e, as partículas acima desse limite são efetivas fisicamente, porque estimulam a mastigação (Maulfair e Heinrichs, 2012).

#### *8.1.1. Ro-Tap com peneira de 1,18 mm*

Mertens (1986; 1997) sugeriu que era importante desenvolver um sistema de exigência de fibra para vacas leiteiras, e que este deveria envolver características do ingrediente que pudessem ser determinadas rotineiramente nos laboratórios. O sistema proposto por Mertens (usando amostras secas e agitação vertical num conjunto de peneiras de laboratório - Ro-Tap) sugeriu que as partículas retidas em uma peneira de 1,18 mm favoreciam a mastigação.



O Ro-Tap foi o equipamento usado em muitas das pesquisas de Mertens. O procedimento recomendado por Mertens especifica um tamanho de amostra de 0,6 L, tamanhos de peneira de 19,0, 13,2, 9,5, 6,7, 4,7, 3,75, 3,35, 2,36, 1,18, 0,60 e 0,30 mm e 10 min de agitação (Mertens, 2005). É um equipamento mais barato e menor que o padrão ASABE e muitas peneiras podem ser usadas e os tamanhos das malhas podem ser personalizados para o uso pretendido (Maulfair e Heinrichs, 2012).

Assim, o teor de FDNfe poderia ser estimado integrando características químicas e físicas determinadas em laboratório, sendo calculado pelo produto do teor de FDN do ingrediente e a proporção de partículas retidas em uma peneira de 1,18 mm (partículas >1,18). A estratificação usando a peneira de 1,18 mm foi definida a partir dos trabalhos de Poppi et al. (1980, 1981), em que, parte pequena de partículas maiores que 1,18 mm saíram do proventrículo. As desvantagens desse método incluem: necessidade de secar as amostras o que faz com que as partículas apresentem tamanho menor que o real, pois quando secas as partículas quebram facilmente; para bovinos leiteiros esse tamanho de partículas (>1,18mm) parece não ser o mais adequado (Yang et al., 2001; Oshita et al., 2004; Maulfair et al., 2011); o método parte do pressuposto que o teor de FDN é uniformemente distribuído entre todas as partículas do alimento testado (Mertens, 1997); considera que todas as partículas retidas em uma peneira de 1,18 mm induzem a mesma atividade mastigatória (Mertens, 1997); e que as diferentes fontes de FDN apresentam a mesma fragilidade (i.e., facilidade de cominuição; Mertens, 1997). Adicionalmente, a agitação vertical tende a separar as partículas por sua dimensão transversal mínima (geralmente largura em partículas de forragem), enquanto a agitação horizontal tende a separar as partículas por seu comprimento (Mertens, 1997, 2005). As peneiras de arame têm espessura muito menor em comparação com as peneiras dos métodos PSPS e ASABE. Como o Ro-Tap usa agitação vertical e amostras secas, ele produz resultados que podem ser muito diferentes das técnicas que usam agitação horizontal e amostras úmidas (separador PSPS e ASABE; Maulfair e Heinrichs, 2012).

### *8.1.2. Separador de partículas ASABE*

O separador da American Society of Agricultural Engineers (ASABE) ou Wisconsin Oscillating Particle Separator é um método utilizado para determinação da distribuição do tamanho de partículas de forragens picadas (WI-OS; S424.1; ASABE, 2007). É um separador de partículas grande (pesando mais de 225 kg), que é operado mecanicamente e usa movimentos de agitação horizontal. O separador possui 5 peneiras

de orifício quadrado com tamanhos de 19,0, 12,7, 6,3, 3,96 e 1,17 mm quando medido nominalmente ou 26,9, 18,0, 8,98, 5,61 e 1,65 mm quando medido diagonalmente. As dimensões das peneiras são 565 mm (comprimento)  $\times$  406 mm (largura)  $\times$  63,5 mm (profundidade). As peneiras são feitas de alumínio de espessura variável, aumentando com o aumento do tamanho dos poros, exceto a tela menor (1,17 mm), que é de arame. As espessuras das peneiras de cima para baixo são 12,7, 9,6, 4,8, 3,1 e 0,64 mm (ASABE, 2007; Maulfair e Heinrichs, 2012). O separador ASABE apresenta algumas vantagens, como: é um método padrão; elimina erros humanos na agitação pois é operado mecanicamente; apresenta número moderado de frações de partículas; as peneiras têm grande área superficial; permitem uma melhor separação de partículas extremamente longas; o método descreve com precisão a distribuição de partículas; e não há necessidade de secagem da amostra (Maulfair e Heinrichs, 2012). A desvantagem é que o equipamento não é portátil e apresenta alto valor para aquisição, limitando seu uso aos laboratórios (Maulfair e Heinrichs, 2012).

### *8.1.3. Separador de partículas da Penn State (PSPS)*

#### *8.1.3.1. Modelo com as peneiras de 19 mm, 8 mm e fundo*

Um método laboratorial simples desenvolvido para estimar a efetividade física da fibra foi proposto por Lammers et al. (1996), como alternativa ao método padrão S424. Um separador manual foi desenvolvido para determinar o tamanho de partícula de forragem e RTM, que permite fácil separação da forragem úmida em três frações e também permite traçar a distribuição do tamanho das partículas. O dispositivo foi projetado para imitar a escala de laboratório do separador padrão S424.1 da ASABE de determinação do tamanho de partícula de forragens. É um método rápido, barato e aplicável em condições de campo para avaliação da distribuição das partículas dos alimentos, composto por duas peneiras (19 mm e 8 mm) e o fundo fechado.

Em uma superfície plana, adiciona-se uma amostra com volume de  $\cong 1,4 \pm 0,5$  L nas peneiras empilhadas, o separador é agitado horizontalmente cinco vezes em uma direção, depois girado um quarto de volta e novamente agitado cinco vezes e assim sucessivamente, por oito séries de cinco agitações, girando na mesma direção entre cada série, totalizando 40 agitações (Lammers et al., 1996). Lammers et al. (1996) determinaram que não houve diferença nos resultados do PSPS e do separador ASABE na predição de frações de partículas em vários testes estatísticos. “Nutricionistas e agricultores precisam de um método prático que seja rápido, preciso e barato para uso

regular na fazenda”, essa é uma afirmação de Lammers et al. (1996) para justificar a implantação e uso do sistema de separação de partículas proposto pelos autores.

#### *8.1.3.2. Modelo com as peneiras de 19 mm, 8 mm, 1,18 mm e fundo*

A inclusão de uma peneira de 1,18 mm ao PSPS foi sugerida por Kononoff et al. (2003), com a justificativa que a RTM normalmente contém 40 a 60% de concentrado e a maior parte dessa porção passa pela peneira de 8,0 mm. Assim, a medição de partículas menores pode ser útil na compreensão dos efeitos do tamanho de partícula da ração na função ruminal e fermentação, uma vez que foi sugerido que 1,18 mm fosse o comprimento crítico que rege a retenção no proventrículo (Poppi et al., 1980).

Além disso, foram definidos padrões a serem seguidos durante a operação do PSPS. Foi sugerido agitação a 1,1 Hz ou mais, com um comprimento de curso de 17 cm, ao usar o PSPS para analisar o tamanho da partícula de forragem (Kononoff et al., 2003). Foi verificado que em ambos os tipos de amostras (RTM, silagem de alfafa, silagem de milho) a desidratação causou uma proporção maior de partículas pequenas e uma média geométrica menor (Kononoff et al., 2003), resultado obtido com o peneiramento de amostras com diferentes teores de umidade. O volume de amostra ( $\cong 1,4 \pm 0,5$  L) e o número de agitações (40) foram mantidas.

A inclusão da peneira de 1,18 mm foi bastante criticada, pois o comprimento crítico que rege a retenção de partículas no proventrículo para bovinos leiteiros foi sugerido ser maior que 1,18 mm e pode ser entre 3,0 e 5,0 mm (Shaver et al., 1988; Maulfair et al., 2011). Além disso, os resultados do peneiramento de amostras úmidas geram resultados distintos daqueles obtidos com amostra seca em peneira de 1,18 mm (proposto por Mertens).

#### *8.1.3.3. Modelo com as peneiras de 19 mm, 8 mm, 4 mm e fundo*

Recentemente, a peneira de 1,18 mm foi substituída por uma peneira de 4 mm (Heinrichs, 2013), pois trabalhos provaram que essa medida era equivocada (Maulfair et al., 2011). Heinrichs (2013) sugeriu que esta nova peneira retém pequenas partículas de forragem com alta concentração de fibra e são representativas de partículas tipicamente aprisionadas no mat ruminal. Diferentemente da peneira de 1,18 mm utilizada por Mertens (1986) a PSPS usa peneiramento manual, amostra úmida e agitação horizontal. Entretanto, mais experimentos são necessários para validar a recomendação desta peneira de 4 mm.

#### 8.1.4. Análise por imagem

Alguns estudos mostraram que partículas longas e estreitas podem tombar durante a agitação em peneiras e deslizar através de orifícios menores do que a dimensão mais longa da partícula (Igathinathane et al., 2009). Quando partículas são quase quadradas ou redondas, o fenômeno de inclinação não ocorre porque as duas dimensões são semelhantes. No entanto, quando as partículas são oblongas, as peneiras tendem a reter partículas cuja segunda dimensão mais longa (largura) é maior que a diagonal do orifício da peneira (Igathinathane et al., 2009; Savoie et al., 2014).

Um experimento conduzido por Savoie et al. (2014), avaliou o tamanho das partículas de alfafa e silagem de milho colhidos em três comprimentos teóricos de corte (4,8, 9,5 e 11,1 mm). As partículas eram inicialmente classificadas pelo método de separação padrão ASABE. As partículas em cada peneira foram espalhadas em superfície plana e fotos foram tiradas para posterior análise. O método padrão ASABE subestimou o comprimento de partícula em 31% quando comparado as medidas obtidas por análise de imagem (Savoie et al., 2014).

A incorporação de medidas de área de superfície externa na forragem picada pode melhorar a compreensão da digestibilidade e efetividade da fibra na dieta de vacas leiteiras (Ferrareto et al., 2018). Além disso, a aplicação posterior desta tecnologia para avaliação em tempo real poderia eliminar a análise de peneiramento e melhorar o processo de confecção da silagem (Ferrareto et al., 2018). No entanto, vale ressaltar que esse procedimento ainda não é adotado no campo, principalmente pela ausência de experimentos para sua validação.

### 8.2. Métodos biológicos para determinar a efetividade da fibra

#### 8.2.1. Bioensaio com controle negativo e controle positivo

Os experimentos baseados em ensaios biológicos avaliam o fef da porção FDN de ingrediente com base em resposta animal, como por exemplo, tempo de mastigação, tempo de ruminação, pH ruminal, razão acetato:propionato, consistência do *mat* ruminal, gordura do leite, etc. (Armentano e Pereira, 1997). No delineamento dos bioensaios, são incluídos um tratamento com quantidade adequada de FDN de forragem (FDNf) (controle positivo = CP), outro com nível abaixo do ideal de FDNf (controle negativo = CN) e a(s) dieta(s) que será(ão) testada(s), que deve(m) possuir a mesma fração de FDNf presente no controle negativo acrescido do ingrediente teste até atingir o nível de FDNf do controle

positivo. O fator de efetividade é definido pelo aumento marginal da variável analisada por unidade de FDN do ingrediente testado (Armentano e Pereira, 1997). Primeiramente calcula-se os coeficientes de inclinação regredindo uma dada repostada animal (e.g., tempo de mastigação) sobre o teor de FDN entre CN e CP. Posteriormente assume-se que a FDN da forragem padrão possui fator de efetividade = 1, e para os demais tratamentos os fatores de efetividade são calculados pela divisão do coeficiente de inclinação da dieta teste pelo coeficiente de inclinação da dieta CP (Clark e Armentano, 1993).

Vários ensaios biológicos para avaliar a efetividade da FDN de subprodutos foram conduzidos pela equipe do professor Loius E. Armentano da Universidade de Wisconsin (Madison). Clark e Armentano (1993) testaram a efetividade da FDN de subprodutos como, caroço de algodão e grãos secos de destilaria (GSD) em relação a uma dieta basal com baixo teor de fibra (13% de FDN de feno de alfafa) e outra com alta forragem (19% de FDN de feno de alfafa). As dietas testes continham 13% FDN de feno de alfafa mais 6% de FDN proveniente do ingrediente teste. A substituição de 6% do feno alfafa por caroço de algodão ou DDG promoveu aumento no CMS e na produção de gordura e proteína do leite. O fef do caroço de algodão foi superior à forragem padrão (feno de alfafa). A inclusão de FDN de caroço de algodão estimulou mais a mastigação do que a dieta com alta forragem. Na dieta com deficiência de fibra, tanto o caroço de algodão como o DDG foram capazes de estimular a ruminação e a síntese de gordura do leite. A avaliação de subprodutos fibrosos através dos ensaios biológicos se deve ao fato de que esses alimentos alternativos de alta energia e alta fibra são difíceis de categorizar como concentrados ou forragens.

Buscando determinar a efetividade da FDN de diferentes FFNF (farelo de glúten de milho, cascas de aveia, grãos secos de cervejaria e polpa de beterraba) em relação a FDN da silagem de alfafa, Swain e Armentano (1994) conduziram dois ensaios biológicos. Quando adicionado à dieta com baixo teor de fibras, as FFNF elevaram a concentração de gordura do leite aproximadamente com metade da efetividade da FDN da alfafa. Já a atividade de mastigação foi menos afetada pelas FFNF do que a concentração de gordura do leite (Swain e Armentano, 1994).

Depies e Armentano (1995), determinaram a efetividade da FDN de espigas de milho moídas e farelo de trigo em relação à silagem de alfafa. Considerando que os resultados são medidos em estudos de curto prazo e com base na gordura do leite, a efetividade da FDN desses subprodutos foi aproximadamente metade da FDN de silagem de alfafa. As FFNF se mostraram capazes de aumentar os teores de gordura em dietas

com pouca fibra (CN) e diminuir o tempo de ruminação em comparação com dieta rica em alfafa (CP) (423 a 390 min/d).

A redução da porcentagem de gordura do leite e do tempo de mastigação para FDN de FFNF em comparação com FDN da silagem alfafa não é surpreendente, considerando o efeito claro do tamanho de partícula da forragem longa e o tamanho de partícula muito curto das FFNF (Woodford et al., 1986; Depies e Armentano, 1995). Baseado nessas informações Depies e Armentano (1995) afirmam que uma interpretação razoável seria atribuir cerca de metade da efetividade da FDN da silagem de alfafa ao seu tamanho de partícula, sendo que esse efeito não pode ser substituído por FDN da maioria das FFNF ou alfafa peletizada. A outra metade da efetividade da FDN da silagem de alfafa e toda a efetividade da FDN da maioria dos NFFS, deve-se ao efeito da substituição de CNF por FDN (Depies e Armentano, 1995). Outros experimentos utilizando a metodologia dos ensaios biológicos também foram desenvolvidos pela equipe do professor Armentano (Clark e Armentano, 1993; 1997a; 1997b; 1999; Pereira et al., 1999; Pereira e Armentano, 2000). Na tabela 5 reunimos fatores de efetividade publicados na literatura com base em teor de gordura do leite (%) e atividade mastigatória (min/d). Os trabalhos foram selecionados quando todas os requisistos necessários para o cálculo do fator de efetividade estavam disponíveis, e os experimentos sem o tratamento CN foram excluídos. Como podemos ver, tanto para volumosos como para subprodutos foi observado maiores valores dos fatores de efetividade obtidos por resposta em gordura do leite do que quando obtidos por resposta de atividade mastigatória. É interessante notar que a magnitude da diferença entre os fatores de efetividade obtidos por mastigação e gordura no leite apresenta-se maior para os subprodutos, comparativamente às forragens e ao caroço de algodão. Esse resultado não é novidade e já foi relatado em diversos trabalhos. Quando baseados na gordura do leite em comparação com a mastigação, maiores fatores de efetividade foram verificados por Swain e Armentano (1994). Outros autores também relatam ou descreveram essa tendência de resultado (Clark e Armentano, 1993; Armentano e Pereira, 1997; Mertens, 1997). Esse resultado comprova que a gordura do leite é uma resposta de menor precisão para prevenir problemas relacionados a baixa inclusão de FDNfe. Com base no valor médio de fe de subprodutos medido por ruminação ou mastigação (i.e., fef) nota-se que a efetividade física da FDN de subprodutos fibrosos é em geral um terço da efetividade física da FDN de alfafa.

### 8.2.2. Bioensaio sem controle negativo

Alternativamente, o fef pode ser determinado num ensaio biológico sem o controle negativo. Com base no teor de FDN e no tempo de mastigação, Mooney e Allen (1997) calcularam a efetividade física da fibra do caroço de algodão em relação à silagem de alfafa (com dois tamanhos de corte). Os autores consideram que a efetividade da fração FDN de concentrados é igual a zero e utilizam um valor fixo de mastigação basal de 355 min/d. A vantagem deste método é a possibilidade de reduzir um tratamento experimental, mas como desvantagem tem-se que o tempo de mastigação basal pode ser variável entre experimentos (Armentano e Pereira, 1997).

Ambas os métodos de bioensaio (Armentano e Pereira, 1997; Mooney e Allen, 1997) utilizam animais e consideram que os ingredientes a serem testados precisam ser comparados com um padrão, o qual hipoteticamente apresenta o valor padrão de mastigação por quilograma de MS ou FDN. Também consideram que a fração FDN do volumoso padrão é completamente efetiva ( $fef = 1$ ) e a fração de FDN proveniente de ingredientes concentrados (e.g., milho, farelo de soja) nas dietas padronizadas (CN e CP) não é efetiva ( $fef = 0$ ) (Armentano e Pereira, 1997; Mooney e Allen, 1997).

Os bioensaios, entretanto, são onerosos para determinação da efetividade de cada ingrediente com características físicas específicas, pois necessita de experimentos com animais. Geralmente esse método é usado para pesquisa. Porém, uma alternativa seria integrar os bioensaios aos métodos laboratoriais para determinação dos fef.

**Tabela 5.** Comparativo de fatores de efetividade com base na gordura do leite, ruminação e mastigação total

Referência	Ingrediente	Fator de efetividade <sup>1</sup>		
		Gordura do leite (%)	Mastigação (min/d)	Ruminação (min/d)
<b>Volúmosos</b>				
Clark e Armentano (1999) (Ano 2)	Silagem de milho "longa" (TMP = 6,53 mm)	0,99	0,87	1,23
Clark e Armentano (1999) (Ano 2)	Silagem de milho "curta" (TMP = 2,57 mm)	0,99	0,61	0,76
Clark e Armentano (1999) (Ano 2)	Silagem de milho "longa + curta"	0,88	0,57	0,59
	<i>Média</i>	<i>0,96</i>	<i>0,68</i>	<i>0,86</i>
		<i>fe mastigação/fe gordura do leite =</i>		<i>0,72</i>
		<i>fe ruminação/fe gordura do leite =</i>		<i>0,90</i>
		<i>fe ruminação/fe mastigação =</i>		<i>1,26</i>
<b>Caroço de algodão</b>				
Clark e Armentano (1993)	Caroço de algodão integral	1,29	0,91	1,18
		<i>fe mastigação/fe gordura do leite =</i>		<i>0,71</i>
		<i>fe ruminação/fe gordura do leite =</i>		<i>0,92</i>
		<i>fe ruminação/fe mastigação =</i>		<i>1,30</i>
<b>Subprodutos</b>				
Clark e Armentano (1993)	Grãos secos de destilaria	1,06	0,00	0,00
Clark e Armentano (1997a)	Polpa de beterraba integral	0,21	0,21	0,58
Clark e Armentano (1997a)	Polpa de beterraba moída	0,64	0,21	0,00
Clark e Armentano (1997b)	Subprodutos (caroço algodão, grãos secos destilaria, far. trigo) (menor inclusão)	0,40	0,40	0,60
Clark e Armentano (1997b)	Subprodutos (caroço algodão, grãos secos destilaria, far. trigo) (maior inclusão)	0,51	0,13	0,26
Depies e Armentano (1995)	Espiga de milho moída	0,76	0,57	0,55
Depies e Armentano (1995)	Farelo de trigo	1,53	0,44	0,78
Pereira et al. (1999) (Exp.contínuo)	Subprodutos (far. trigo, far. glúten milho, res. cervejaria) (sem bicarbonato)	0,26	0,31	0,31
Pereira et al. (1999) (Exp.contínuo)	Subprodutos (far. trigo, far. glúten milho, res. cervejaria) (com bicarbonato)	0,22	0,35	0,13
Swain e Armentano (1994) (Exp. 1)	Resíduo de cervejaria seco	0,12	0,58	.
Swain e Armentano (1994) (Exp. 1)	Farelo de glúten de milho	0,68	0,03	.
Swain e Armentano (1994) (Exp. 1)	Casca de aveia	0,56	0,00	.
Swain e Armentano (1994) (Exp. 2)	Farelo de glúten de milho	0,40	0,00	.
Swain e Armentano (1994) (Exp. 2)	Polpa de beterraba	0,43	0,49	.
Swain e Armentano (1994) (Exp. 2)	Casca de aveia	0,71	0,16	.
Swain e Armentano (1994) (Exp. 2)	Resíduo de cervejaria seco	0,46	0,33	.
Swain e Armentano (1994) (Exp. 2)	Radicula de malte	0,48	0,12	.
	<i>Média</i>	<i>0,55</i>	<i>0,26</i>	<i>0,36</i>
		<i>fe mastigação/fe gordura do leite =</i>		<i>0,46</i>
		<i>fe ruminação/fe gordura do leite =</i>		<i>0,58</i>
		<i>fe ruminação/fe mastigação =</i>		<i>1,22</i>

<sup>1</sup>Silagem de alfafa foi utilizada como fonte de fibra referência (fe = 1).



## 9. Integração do bioensaio e o separador de partículas PSPS

O conceito de FDNfa, adotado pelo novo modelo nutricional para bovinos leiteiros da Academia Nacional de Ciências, Engenharia e Medicina dos EUA (NASEM, 2021), presume que a proporção de partículas retidas na peneira de 19 mm e na peneira de 8 mm sejam consideradas separadamente, enquanto as partículas <8 mm são desconsideradas. Muitas são as teorias difundidas no campo sobre os tamanhos de partículas da forragem e, em muitos casos, assume-se que a FDN das partículas retidas na peneira de 19 mm é mais efetiva que a FDN das partículas retidas na peneira de 8 mm. Entretanto, o fef de partículas retidas em diferentes peneiras do PSPS nunca foi determinado experimentalmente. Dessa forma, estudos que integrem as respostas dos animais (bioensaio) às diferentes frações de fibra estratificadas com o PSPS devem gerar informações que direcionem a formulação de dietas com maior precisão no campo.

### REFERÊNCIAS

- ALI, O. et al. Transport of acetate and sodium in sheep omasum: mutual, but asymmetric interactions. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 176, n. 5, p. 477-487, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00360-006-0069-8>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ALLEN, D. M.; GRANT, R. J. Interactions between forage and wet corn gluten feed as sources of fiber in diets for lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 2, p. 322-331, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74882-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74882-X)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 7, p. 1447-1462, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76074-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76074-0)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ALLEN, M. S.; MERTENS, D. R. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. **The Journal of Nutrition**, v. 118, n. 2, p. 261-270, 1988. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jn/118.2.261>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 7, p. 1598-1624, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75030-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75030-2)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ALSEMGEEST, S. P. M. et al. Concentrations of serum Amyloid-a (SAA) and haptoglobin (HP) as parameters of inflammatory diseases in cattle. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 1, p. 21-23, 1994.
- ALZAHAL, O. et al. A mathematical approach to predicting biological values from ruminal pH measurements. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 8, p. 3777-3785, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2006-534>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ALZAHAL, O. et al. Ruminal temperature may aid in the detection of subacute ruminal acidosis. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 1, p. 202-207, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0535>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.

- AMETAJ, B. N.; ZEBELI, Q.; IQBAL, S. Nutrition, microbiota, and endotoxin-related diseases in dairy cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 433-444, 2010a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300048>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- AMETAJ, B. N. et al. Metabolomics reveals unhealthy alterations in rumen metabolism with increased proportion of cereal grain in the diet of dairy cows. **Metabolomics**, v. 6, n. 4, p. 583-594, 2010b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11306-010-0227-6>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ANDERSSON, L.; BERGMAN, A. Pathology of bovine laminitis especially as regards vascular lesions. **Acta veterinaria scandinavica**, v. 21, n. 4, p. 559-566, 1980. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/BF03546843>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ARMENTANO, L.; PEREIRA, M. Measuring the effectiveness of fiber by animal response trials. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 7, p. 1416-1425, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76071-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76071-5)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ASABE. Method of determining and expressing particle size of chopped forage materials by screening. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**; Standard No.: S424.1:663–665. 2007
- ASABE. Methods of determining and expressing fineness of feed materials by sieving. **St. Joseph (MI): American Society of Agricultural and Biological Engineers**; Standard No.: S319.4; p. 1–8, 2008.
- ASCHENBACH, J. R.; GÄBEL, G. Effect and absorption of histamine in sheep rumen: significance of acidotic epithelial damage. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 2, p. 464-470, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/2000.782464x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ASCHENBACH, J. R. et al. Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 296, n. 5, p. G1098-G1107, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpgi.90442.2008>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ASCHENBACH, J. R. et al. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of animal science**, v. 89, n. 4, p. 1092-1107, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas.2010-3301>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ASCHENBACH, J. R. et al. Symposium review: The importance of the ruminal epithelial barrier for a healthy and productive cow. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 2, p. 1866-1882, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2018-15243>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ASH, R. W.; DOBSON, A. The effect of absorption on the acidity of rumen contents. **The Journal of physiology**, v. 169, n. 1, p. 39, 1963. Disponível em: <<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1963.sp007240>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- BAILEY, C. B.; BALCH, C. C. Saliva secretion and its relation to feeding in cattle: 2.\* The composition and rate of secretion of mixed saliva in the cow during rest. **British Journal of Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 383-402, 1961. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/BJN19610048>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- BAL, M. A. et al. Crop processing and chop length of corn silage: Effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 6, p. 1264-1273, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74993-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74993-9)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.

- BALCH, C. C. Proposal to use time spent chewing as an index of the extent to which diets for ruminants possess the physical property of fibrousness characteristic of roughages. **British Journal of Nutrition**, v. 26, n. 3, p. 383-392, 1971. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/BJN19710045>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- BALDWIN R. L. VI, Use of isolated ruminal epithelial cells in the study of rumen metabolism. **The Journal of nutrition**, v. 128, n. 2, p. 293S-296S, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jn/128.2.293S>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- BATAJOO, K. K.; SHAVER, R. D. Impact of nonfiber carbohydrate on intake, digestion, and milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 6, p. 1580-1588, 1994. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77100-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77100-9)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology today**, v. 15, n. 2, p. 74-80, 1994. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90137-6](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90137-6)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- BAUMGARD, L. H. et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2155-2163, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74294-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74294-X)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. 2003. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci.* 86:630–643. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73641-8
- BEAUCHEMIN, K. A. Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 6, p. 4762-4784, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13706>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- BEAUCHEMIN, K. A. **New Physically Effective Fiber Recommendations for High Producing Dairy Cows**. International Symposium on Forage Quality and Conservation. Piracicaba: ESALQ, p.272, 2019.
- BERTOK, L. Effect of bile acids on endotoxin in vitro and in vivo (physico-chemical defense). Bile deficiency and endotoxin translocation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.851, 408–410, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09016.x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- BHATTI, S. A.; FIRKINS, J. L. Kinetics of hydration and functional specific gravity of fibrous feed by-products. **Journal of Animal Science**, v.73, n.5, p.1449-1458, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/1995.7351449x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- BÖDEKER, D. et al. Effects of short-chain fatty acids on electrophysiological properties and permeability characteristics of sheep (*Ovis aries*) abomasal mucosa. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v.107, n.1, p.73-79, 1994. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90276-3](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90276-3)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- BOLTEN, J. R. et al. Normal abomasal electromyography and emptying in sheep and the effects of intraabomasal volatile fatty acid infusion. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, n. 12, p. 1387-1392, 1976. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/999066>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- BUDRAS, K. D.; MÜLLING, C.; HOROWITZ, A. Rate of keratinization of the wall segment of the hoof and its relation to width and structure of the zona alba (white

- line) with respect to claw disease in cattle. **American journal of veterinary research**, v.57, n.4, p.444-455, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8712505/>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- BUGAUT, M. Occurrence, absorption and metabolism of short chain Fatty acids in the digestive tract of mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.86, n.3, p.439-472, 1987. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(87\)90433-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(87)90433-0)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CABANA, V. G.; REARDON C. A.; WEI B.; LUKENS, J. R.; GETZ, G. S. 1999. SAA-only HDL formed during the acute phase response in apoA-I<sup>+/+</sup> and apoA-I<sup>-/-</sup> mice. **J. Lipid Res.** v.40, n.6, p.1090–1103. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10357841/>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CARTER, R. R.; GROVUM, W. L. A review of the physiological significance of hypertonic body fluids on feed intake and ruminal function: salivation, motility and microbes. **Journal of Animal Science**, v.68, n.9, p.2811-2832, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/1990.6892811x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CASSIDA, K. A.; STOKES, M. R. 1986. Eating and resting salivation in early lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 69, n.5, p.1282-1292. Disponível em: <[10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80534-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80534-3)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CHANG, G. et al. Epigenetic mechanisms contribute to the expression of immune related genes in the livers of dairy cows fed a high concentrate diet. **PLoS ONE**, v.10, p.e0123942, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123942>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CLARK, P. W.; ARMENTANO, L. E. Influence of particle size on the effectiveness of the fiber in corn silage. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.3, p.581-588, 1999. Disponível em: <[10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75270-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75270-7)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CLARK, P. W.; ARMENTANO, L. E. Influence of particle size on the effectiveness of beet pulp fiber. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.5, 898-904, 1997a. Disponível em: <[10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76012-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76012-0)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CLARK, P. W.; ARMENTANO, L. E. Replacement of alfalfa neutral detergent fiber with a combination of nonforage fiber sources. **Journal of dairy science**, v.80, n.4, 675-680, 1997b. Disponível em: <[10.3168/jds.S0022-0302\(97\)75986-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)75986-1)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CLARK, P. W.; ARMENTANO, L. E. Effectiveness of neutral detergent fiber in whole cottonseed and dried distillers grains compared with alfalfa haylage. **Journal of dairy science**, 76:2644, 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8227666/>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CLAUSS, M. et al. The effect of size and density on the mean retention time of particles in the reticulorumen of cattle (*Bos primigenius* f. *taurus*), muskoxen (*Ovibos moschatus*) and moose (*Alces alces*). **British Journal of Nutrition**, v.105, n.4, 634–644, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0007114510004101>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- COLENBRANDER, V. F.; NOLLER, C. H.; GRANT, R. J. 1991. Effect of fiber content and particle size of alfalfa silage on performance and chewing behavior. **Journal of dairy science**, v.74, n.8, 2681-2690. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1655845/>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- COLMAN, E. et al. Effect of induction of subacute ruminal acidosis on milk fat profile and rumen parameters. **Journal of dairy science**, v.93, n.10, p.4759-4773, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3158>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.

- COLUCCI, P. E. et al. Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. **Journal of dairy science**, v. 73, n. 8, p. 2143-2156, 1990. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78895-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78895-9)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CONTE, G. et al. A canonical discriminant analysis to study the association between milk fatty acids of ruminal origin and milk fat depression in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 7, p. 6497-6510, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13941>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CORL, B. A. et al. Regulation of milk fat yield and fatty acid composition by insulin. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 11, p. 4172-4175, 2006. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72462-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72462-6)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- COSTA, S. F. et al. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e a epiderme de bezerros: I Aspectos histológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 1-9, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000100002>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- COTANCH, K. W. et al. Applications of uNDF in ration modeling and formulation. p.114-131, 2014. Disponível em: <[https://ecommons.cornell.edu/bitstream/handle/1813/37979/CNC2014\\_15\\_Grant\\_Cotanch.pdf;sequence=1](https://ecommons.cornell.edu/bitstream/handle/1813/37979/CNC2014_15_Grant_Cotanch.pdf;sequence=1)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CRICHLOW, E. C.; CHAPLIN, R. K. Ruminal lactic acidosis: relationship of forestomach motility to nondissociated volatile fatty acids levels. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 9, p. 1908-1911, 1985. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/3931518>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CRICHLOW, E. C. Ruminal lactic acidosis: forestomach epithelial receptor activation by undissociated volatile fatty acids and rumen fluids collected during loss of reticulorumen motility. **Research in veterinary science**, v. 45, n. 3, p. 364-368, 1988. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)30966-4](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)30966-4)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- CROSSLEY, R. E.; HARLANDER-MATAUSCHEK, A.; DEVRIES, T. J. Variability in behavior and production among dairy cows fed under differing levels of competition. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 5, p. 3825-3838, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2016-12108>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- DANIEL, J. L. P. et al. Short-term effects of silage volatile compounds on feed intake and digestion in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 5, p. 2321-2331, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas.2012-5657>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- DANIEL, J. L. P.; RESENDE JÚNIOR, J. C. Absorption and metabolism of volatile fatty acids by rumen and omasum. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 1, p. 93-99, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1413-70542012000100012>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- DANIEL, J. L. P.; RESENDE JÚNIOR, J. C.; CRUZ, F. J. Ruminoreticulum and omasum participation in the bovine total absorptive proventricle surface. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**, v. 43, p. 688-694, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26579>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- DANIEL, J. L. P. et al. Funcionalidade do sulco do retículo em bovinos adultos e avaliação de técnicas alternativas para preparação, infusão e coleta de marcadores

- da fase fluida ruminal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1850-1856, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000600037>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- DANIELLI, J. F. et al. The mechanism of absorption from the rumen as exemplified by the behaviour of acetic, propionic and butyric acids. **Journal of Experimental Biology**, v. 22, n. 1-2, p. 75-84, 1945. Disponível em: <<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.539.1900&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- DEPIES, K. K.; ARMENTANO, L. E. Partial replacement of alfalfa fiber with fiber from ground corn cobs or wheat middlings. **Journal of dairy science**, v. 78, n. 6, p. 1328-1335, 1995. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76754-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76754-6)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- DEVRIES, T. J.; DOHME, F.; BEAUCHEMIN, K. A. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feed sorting. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 10, p. 3958-3967, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1347>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- DEWANCKELE, L. et al. Invited review: Role of rumen biohydrogenation intermediates and rumen microbes in diet-induced milk fat depression: An update. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 9, p. 7655-7681, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17662>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- DIJKSTRA, J. et al. Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH. **Animal Feed Science and Technology**, v. 172, n. 1-2, p. 22-33, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.005>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- DIJKSTRA, J. et al. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. **British Journal of Nutrition**, v. 69, n. 2, p. 385-396, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/BJN19930041>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- DIRKSEN, G. U.; LIEBICH, H. G.; MAYER, E. Adaptive changes of the ruminal mucosa and their functional and clinical significance. **The Bovine Practitioner**, p. 116-120, 1985. Disponível em: <<https://doi.org/10.21423/bovine-vol1985no20p116-120>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- DUFFIELD, T. et al. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 1, p. 59-66, 2004. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73142-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73142-2)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- DUNLOP, R. H.; HAMMOND, P. B; D-lactic acidosis of ruminants. **Ann NY Acad Sci**, v.119, n.3, p.1061-1065, 1965. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1965.tb47466.x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ELSASSER, T. H. et al. Critical control points in the impact of the proinflammatory immune response on growth and metabolism. **Journal of animal science**, v. 86, n. suppl\_14, p. E105-E125, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas.2007-0634>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- EMMANUEL, D. G. V. et al. Acidosis and lipopolysaccharide from Escherichia coli B: 055 cause hyperpermeability of rumen and colon tissues. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5552-5557, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0257>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- EMMANUEL, D. G. V.; DUNN, S. M.; AMETAJ, B. N. Feeding high proportions of barley grain stimulates an inflammatory response in dairy cows. **Journal of Dairy**

- Science**, v. 91, n. 2, p. 606-614, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0256>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ENOMOTO, N. et al. Kupffer cell sensitization by alcohol involves increased permeability to gut-derived endotoxin. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 25, p. 51S-54S, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2001.tb02418.x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- EWASCHUK, J. B.; NAYLOR, J. M.; ZELLO, G. A. Anion gap correlates with serum D-and DL-lactate concentration in diarrheic neonatal calves. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 17, n. 6, p. 940-942, 2003.
- EWASCHUK, J. B. et al. D-lactate production and excretion in diarrheic calves. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 18, n. 5, p. 744-747, 2004.
- FERNANDO, S. C. et al. Ruminal microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 22, p. 7482-7490, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.00388-10>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- FERRARETTO, L. F.; CRUMP, P. M.; SHAVER, R. D. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 1, p. 533-550, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2012-5932>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D.; LUCK, B. D. Silage review: Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 3937-3951, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13728>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- FIRKINS, J. L. Optimizing rumen fermentation. In: **Tri-State Dairy Nutr. Conf. Fort Wayne, IN**. 2002. p. 39-53.
- FIRKINS, J. L. Effects of feeding nonforage fiber sources on site of fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1426-1437, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76072-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76072-7)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England journal of medicine**, v. 340, n. 6, p. 448-454, 1999. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm199902113400607>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GÄBEL, G.; ASCHENBACH, J. R.; MÜLLER, F. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. **Animal health research reviews**, v. 3, n. 1, p. 15-30, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/AHRR200237>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GÄBEL, G. et al. The effect of diet, intraruminal pH and osmolarity on sodium, chloride and magnesium absorption from the temporarily isolated and washed reticulo-rumen of sheep. **Quarterly Journal of Experimental Physiology: Translation and Integration**, v. 72, n. 4, p. 501-511, 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1987.sp003092>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GAEBEL, G.; MARTENS, H. Reversibility of acid induced changes in absorptive function of sheep rumen. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 35, n. 1-10, p. 157-160, 1988. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1988.tb00019.x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.

- GARRETT, E. F. et al. Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 6, p. 1170-1178, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75340-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75340-3)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GENTILE, A. et al. D-lactic acidosis in calves as a consequence of experimentally induced ruminal acidosis. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 51, n. 2, p. 64-70, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00600.x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GIANESELLA, M. et al. Subacute ruminal acidosis and evaluation of blood gas analysis in dairy cow. **Veterinary medicine international**, v. 2010, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.4061/2010/392371>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GILL, H. S.; SHU, Q.; LENG, R. A. Immunization with *Streptococcus bovis* protects against lactic acidosis in sheep. **Vaccine**, v. 18, n. 23, p. 2541-2548, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00017-7)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GOAD, D. W.; GOAD, C. L.; NAGARAJA, T. G. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. **Journal of animal science**, v. 76, n. 1, p. 234-241, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/1998.761234x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GORDON, G. L. R.; PHILLIPS, M. W. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. **Nutrition Research Reviews**, v. 11, n. 1, p. 133-168, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/NRR19980009>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GOZHO, G. N.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. Rumen lipopolysaccharide and inflammation during grain adaptation and subacute ruminal acidosis in steers. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 11, p. 4404-4413, 2006b. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72487-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72487-0)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GOZHO, G. N.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 2, p. 856-866, 2007. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71569-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71569-2)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GOZHO, G. N. et al. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 4, p. 1399-1403, 2005. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72807-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72807-1)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GOZHO, G. N.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. Effects of gradual adaptation to concentrate and subsequent induction of subacute ruminal acidosis in steers on ruminal lipopolysaccharide and acute phase proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4404-4413, 2006a. Disponível em: <>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GRAHAM, C.; SIMMONS, N. L. Functional organization of the bovine rumen epithelium. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 1, p. R173-R181, 2005. Disponível em: <>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GRANT, R. J. Interactions among forages and nonforage fiber sources. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 7, p. 1438-1446, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76073-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76073-9)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.



- GRANT, R. J.; FERRARETTO, L. F. Silage review: Silage feeding management: Silage characteristics and dairy cow feeding behavior. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4111-4121, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13729>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GRANT, R. J.; COLENBRANDER, V. F.; MERTENS, D. R. Milk fat depression in dairy cows: role of silage particle size. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 7, p. 1834-1842, 1990. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78863-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78863-7)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GRANT, R. J. et al. Relationships between undigested and physically effective fiber in lactating dairy cows. 2018. Disponível em: <<https://ecommons.cornell.edu/handle/1813/59839>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GREGORY, P. C. Inhibition of reticulo-ruminal motility by volatile fatty acids and lactic acid in sheep. **The Journal of Physiology**, v. 382, n. 1, p. 355-371, 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016371>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GRESSLEY, T. F.; HALL, M. B.; ARMENTANO, L. E. Ruminant nutrition symposium: productivity, digestion, and health responses to hindgut acidosis in ruminants. **Journal of animal science**, v. 89, n. 4, p. 1120-1130, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas.2010-3460>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GRIINARI, J. M. et al. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 5, p. 1251-1261, 1998. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75686-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75686-3)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- GROVUM, W. L.; WILLIAMS, V. J. Rate of passage of digesta in sheep: 6. The effect of level of food intake on mathematical predictions of the kinetics of digesta in the reticulorumen and intestines. **British journal of Nutrition**, v. 38, n. 3, p. 425-436, 1977. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/BJN19770107>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- HARMON, D. L. et al. Net portal absorption of lactate and volatile fatty acids in steers experiencing glucose-induced acidosis or fed a 70% concentrate diet ad libitum. **Journal of animal science**, v. 60, n. 2, p. 560-569, 1985. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas1985.602560x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- HEINRICH, A. J. The Penn State Particle Separator. Extension publication DSE 2013-186. 2013. Disponível em: <<https://extension.psu.edu/penn-state-particle-separator>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- HENDRY, K. A. K. et al. Effect of endocrine and paracrine factors on protein synthesis and cell proliferation in bovine hoof tissue culture. **Journal of dairy research**, v. 66, n. 1, p. 23-33, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0022029998003288>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- HOEBEN, D. et al. Role of endotoxins and TNFalpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. **Journal of dairy research**, 67, 503-514, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11131064/>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- HOLLMANN, M. et al. Downregulation of cellular protective factors of rumen epithelium in goats fed high energy diet. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81602, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081602>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- HOOK, S. E. et al. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation and recovery on the density and diversity of bacteria in the rumen of dairy cows. **FEMS**

- microbiology ecology**, v. 78, n. 2, p. 275-284, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01154.x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- HORADAGODA, N. U. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, v. 144, n. 16, p. 437-441, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/vr.144.16.437>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- HUBER, T. L. Physiological effects of acidosis on feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 902-909, 1976. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas1976.434902x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- HUMER, E. et al. Invited review: Practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 2, p. 872-888, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13191>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- HUNGATE, R. E. et al. Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep. **Cornell veterinarian**, v. 42, p. 423-449, 1952. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19531402099>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- HUNTINGTON, G. B.; PRIOR, R. L.; BRITTON, R. A. Glucose and lactate absorption and metabolic interrelationships in lambs switched from low to high concentrate diets. **The Journal of Nutrition**, v. 110, n. 9, p. 1904-1913, 1980. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jn/110.9.1904>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- HURLEY, J. C. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 2, p. 268-292, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/CMR.8.2.268>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- IGATHINATHANE, C. et al. Sieveless particle size distribution analysis of particulate materials through computer vision. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 66, n. 2, p. 147-158, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.compag.2009.01.005>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- IQBAL, S. et al. Feeding rolled barley grain steeped in lactic acid modulated energy status and innate immunity in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 11, p. 5147-5156, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3118>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- JACOBSEN, S. et al. Dose dependency and individual variability of the lipopolysaccharide-induced bovine acute phase protein response. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3330-3339, 2004. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73469-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73469-4)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 4, p. 637-646, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.637-646.2003>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- JOHNSON, L. et al. Nutritive value of corn silage as affected by maturity and mechanical processing: A contemporary review. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 12, p. 2813-2825, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75540-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75540-2)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KAMMES, K. L.; ALLEN, M. S. Nutrient demand interacts with grass particle length to affect digestion responses and chewing activity in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 2, p. 807-823, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2011-4588>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.

- KANIA, B. F.; DUTKIEWICZ, M.; BRIKAS, P. Different reactions of sheep to the intravenously administered of histamine. **Annals of Warsaw Agricultural University. Veterinary Medicine**, v. 19, p. 91-97, 1994. Disponível em: <<https://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-article-660b3313-c95f-4134-b413-3a973d141a07>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KAUFFOLD, P.; VOIGT, J.; HERRENDÖRFER, G. The effect of nutritional factors on the ruminal mucosa. 3. Condition of the mucosa after infusion of propionic acid, acetic acid and butyric acid. **Archiv fur Tierernahrung**, v. 27, n. 3, p. 201-211, 1977. Disponível em: <<https://europemc.org/article/med/871252>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KAWAS, J. R.; JORGENSEN, N. A.; DANELON, J. L. Fiber requirements of dairy cows: optimum fiber level in lucerne-based diets for high producing cows. **Livestock Production Science**, v. 28, n. 2, p. 107-119, 1991. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0301-6226\(91\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0301-6226(91)90002-8)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KHAFFIPOUR, E.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 4, p. 1712-1724, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1656>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KHAFFIPOUR, E. et al. Effects of grain feeding on microbiota in the digestive tract of cattle. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 2, p. 13-19, 2016. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/301223492\\_Effects\\_of\\_grain\\_feeding\\_on\\_microbiota\\_in\\_the\\_digestive\\_tract\\_of\\_cattle](https://www.researchgate.net/publication/301223492_Effects_of_grain_feeding_on_microbiota_in_the_digestive_tract_of_cattle)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KHAFFIPOUR, E.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 3, p. 1060-1070, 2009a. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1389>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KHAFFIPOUR, E. et al. Population structure of rumen *Escherichia coli* associated with subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 351-360, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3435>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KHAFFIPOUR, E. et al. Ruminal microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 22, p. 7115-7124, 2009b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.00739-09>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KHORASANI, G. R.; OKINE, E. K.; KENNELLY, J. J. Effects of substituting barley grain with corn on ruminal fermentation characteristics, milk yield, and milk composition of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 12, p. 2760-2769, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74730-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74730-3)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KHORRAMI, B.; KHIAOSA-ARD, R.; ZEBELI, Q. Models to predict the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cows based on dietary and cow factors: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 7, p. 7761-7780, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19890>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KIRAT, D. et al. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen. **The Journal of physiology**, v. 576, n. 2, p. 635-647, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.115931>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.

- KLEEN, J. L. et al. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 50, n. 8, p. 406-414, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2003.00569.x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KOHN, R. A.; DUNLAP, T. F. Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 6, p. 1702-1709, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/1998.7661702x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KONONOFF, P. J.; HEINRICHS, A. J.; BUCKMASTER, D. R. Modification of the Penn State forage and total mixed ration particle separator and the effects of moisture content on its measurements. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 5, p. 1858-1863, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73773-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73773-4)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KRAJCARSKI-HUNT, H. et al. Effect of subacute ruminal acidosis on in situ fiber digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 3, p. 570-573, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74110-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74110-6)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KRAUSE, K. M.; OETZEL, G. R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. **Animal feed science and technology**, v. 126, n. 3-4, p. 215-236, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.004>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KRISTENSEN, N. B.; HARMON, D. L. Effect of increasing ruminal butyrate absorption on splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers. **Journal of animal science**, v. 82, n. 12, p. 3549-3559, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/2004.82123549x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KRISTENSEN, N. B. et al. Portal recovery of short-chain fatty acids infused into the temporarily-isolated and washed reticulo-rumen of sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 4, p. 477-482, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0007114500001781>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- KRIZSAN, S. J.; AHVENJÄRVI, S.; HUHTANEN, P. A meta-analysis of passage rate estimated by rumen evacuation with cattle and evaluation of passage rate prediction models. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 12, p. 5890-5901, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3457>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- LAMMERS, B. P.; BUCKMASTER, D. R.; HEINRICHS, A. J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of dairy science**, v. 79, n. 5, p. 922-928, 1996. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76442-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76442-1)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- LEEK, B. F.; HARDING, R. H. Sensory nervous receptors in the ruminant stomach and the reflex control of reticulo-ruminal motility. **Digestion and Metabolism in the Ruminant**, p. 60-76, 1975. Disponível em: <<https://eurekamag.com/research/027/367/027367241.php>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- LEIVA, T. et al. Effects of excessive energy intake and supplementation with chromium propionate on insulin resistance parameters in nonlactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 2, p. 775-782, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas.2013-6852>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- LEIVA, T. et al. Effects of concentrate type and chromium propionate on insulin sensitivity, productive and reproductive parameters of lactating dairy cows

- consuming excessive energy. **animal**, v. 11, n. 3, p. 436-444, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S1751731116001713>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- LEONARDI, C.; ARMENTANO, L. E. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 2, p. 557-564, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73634-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73634-0)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- LI, S. et al. Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 1, p. 294-303, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2011-4447>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- LIMA, R. F. et al. Morphological response of the ruminal and omasal mucosae to the variation in diet energy. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, p. 574-582, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1413-70542015000600004>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- LÓPEZ, S. et al. Effects of volatile fatty acid supply on their absorption and on water kinetics in the rumen of sheep sustained by intragastric infusions. **Journal of animal science**, v. 81, n. 10, p. 2609-2616, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/2003.81102609x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- LORENZ, I.; HARTMANN, I.; GENTILE, A. Determination of D-lactate in calf serum samples—an automated enzymatic assay. **Comparative Clinical Pathology**, v. 12, n. 3, p. 169-171, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00580-003-0499-6>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- LORENZ, I. Influence of D-lactate on metabolic acidosis and on prognosis in neonatal calves with diarrhoea. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 51, p. 425-428, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00662.x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MACKIE, R. I.; GILCHRIST, F. M. C. Changes in lactate-producing and lactate-utilizing bacteria in relation to pH in the rumen of sheep during stepwise adaptation to a high-concentrate diet. **Applied and environmental microbiology**, v. 38, n. 3, p. 422-430, 1979. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.38.3.422-430.1979>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MACKIE, R. I.; GILCHRIST, F. M. C.; HEATH, S. An in vivo study of ruminal microorganisms influencing lactate turnover and its contribution to volatile fatty acid production. **The Journal of Agricultural Science**, v. 103, n. 1, p. 37-51, 1984. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0021859600043306>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MAULFAIR, D. D.; HEINRICHS, A. J. Methods to measure forage and diet particle size in the dairy cow. **The Professional Animal Scientist**, v. 28, n. 5, p. 489-493, 2012. Disponível em: <[https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30396-X](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30396-X)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MAULFAIR, D. D.; FUSTINI, M.; HEINRICHS, A. J. Effect of varying total mixed ration particle size on rumen digesta and fecal particle size and digestibility in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 7, p. 3527-3536, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3718>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MAULFAIR, D. D.; MCINTYRE, K. K.; HEINRICHS, A. J. Subacute ruminal acidosis and total mixed ration preference in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 10, p. 6610-6620, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2013-6771>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.

- MCDOUGALL, E. I. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemical journal**, v. 43, n. 1, p. 99, 1948. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1274641/>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MELO, L. Q. et al. Rumen morphometrics and the effect of digesta pH and volume on volatile fatty acid absorption. **Journal of animal science**, v. 91, n. 4, p. 1775-1783, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas.2011-4999>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MERTENS, D. **Effect of physical characteristics, forage particle size and density on forage utilization**. 1986. Disponível em: <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8934955>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MERTENS, D. R. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. **Journal of animal science**, v. 64, n. 5, p. 1548-1558, 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas1987.6451548x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MERTENS, D. R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 7, p. 1463-1481, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76075-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76075-2)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MERTENS, D. R. Measuring fiber and its effectiveness in ruminant diets. In: **Proc Plains Nutr Conf, San Antonio, TX, USA**, p. 40-66, 2002b. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.727.5023&rep=rep1&type=pdf#page=47>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MERTENS, D. R. Particle size, fragmentation index, and effective fiber: Tools for evaluating the physical attributes of corn silages. In: **Proc. Four-State Dairy Nutr. & Mgmt. Conf. MWPS-4SD18. Dubuque, IA**. 2005. p. 211-220. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.539.9023&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MERTENS, D. R.; GRANT, R. J. Digestibility and intake. **Forages: the science of grassland agriculture**, v. 2, p. 609-631, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9781119436669.ch34>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- METZLER-ZEBELI, Barbara U. et al. Grain-rich diets differently alter ruminal and colonic abundance of microbial populations and lipopolysaccharide in goats. **Anaerobe**, v. 20, p. 65-73, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.02.005>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MILLER, M. D. et al. Influence of fiber degradability of corn silage in diets with lower and higher fiber content on lactational performance, nutrient digestibility, and ruminal characteristics in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 2, p. 1728-1743, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19088>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MILLER, M. D.; SMITH, W. A.; GRANT, R. J. Relationship of undigested and physically effective neutral detergent fiber with dry matter intake and energy-corrected milk yield of Holstein cows. **Journal Of Dairy Science**, p.279-279, 2020.
- MILLER-CUSHON, E. K.; DEVRIES, T. J. Feed sorting in dairy cattle: Causes, consequences, and management. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 5, p. 4172-4183, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11983>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MINAMI, N. S. et al. Subacute ruminal acidosis in zebu cattle: clinical and behavioral aspects. **Animals**, v. 11, n. 1, p. 21, 2020.

- MINUTI, A. et al. Experimental acute rumen acidosis in sheep: consequences on clinical, rumen, and gastrointestinal permeability conditions and blood chemistry. **Journal of animal science**, v. 92, n. 9, p. 3966-3977, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas.2014-7594>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MOHAMMED, R. et al. Individual animal variability in ruminal bacterial communities and ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6716-6730, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2012-5772>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MOONEY, C. S.; ALLEN, M. S. Physical effectiveness of the neutral detergent fiber of whole linted cottonseed relative to that of alfalfa silage at two lengths of cut. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 9, p. 2052-2061, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76150-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76150-2)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MOSER, L. E. Quality of forage as affected by post-harvest storage and processing. Crop quality, storage, and utilization, 227-260, 1980. Disponível em: <<https://doi.org/10.2135/1980.cropquality.c9>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- MULLER, F. et al. Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 283, p. G1139-G1146, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00268.2001>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- NAGARAJA, T. G.; GALYEAN, M. L.; COLE, N. A. Nutrition and disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.14, p.257-77, 1998.
- NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of dairy science**, v. 90, p. E17-E38, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2006-478>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- NAGARAJA, T. G. et al. Evidence of endotoxins in the rumen bacteria of cattle fed hay or grain. **Journal of Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 226-234, 1978. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas1978.471226x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- NASROLLAHI, S. M.; IMANI, M.; ZEBELI, Q. A meta-analysis and meta-regression of the effect of forage particle size, level, source, and preservation method on feed intake, nutrient digestibility, and performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8926-8939, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2015-9681>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- NASROLLAHI, S. M.; IMANI, M.; ZEBELI, Q. A meta-analysis and meta-regression of the impact of particle size, level, source and preservation method of forages on chewing behavior and ruminal fermentation in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, p. 144-158, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.012>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 8th ed. National Academy Press, Washington, DC, 2021.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**, 5th revised edition. Natl. Res. Council., Natl. Acad. Sci., Washington, DC, p.76, 1978.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**, 6th revised edition. Natl. Res. Council., Natl. Acad. Sci., Washington, DC. p.76, 1988.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL et al. **Nutrient requirements of dairy cattle: 2001**. National Academies Press, 2001.

- NOCEK, J. E. Bovine acidosis: Implications on laminitis. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 5, p. 1005-1028, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76026-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76026-0)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- NOCEK, J. E.; RUSSELL. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 8, p. 2070-2107, 1988. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79782-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79782-9)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- NORDLUND, K. V.; GARRETT, E. F.; OETZEL, G. R. Herd-based rumenocentesis-a clinical approach to the diagnosis of sub acute rumen acidosis. 1995. Disponível em: <<https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=134047>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- NORDLUND, K. V.; COOK, Nigel B.; OETZEL, G. R. Investigation strategies for laminitis problem herds. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. E27-E35, 2004. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70058-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70058-2)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- NOUSIAINEN, J. et al. Prediction of the digestibility of the primary growth of grass silages harvested at different stages of maturity from chemical composition and pepsin-cellulase solubility. **Animal Feed Science and Technology**, v. 103, n. 1-4, p. 97-111, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00283-3](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00283-3)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- OETZEL, G. R. Clinical aspects of ruminal acidosis in dairy cattle. In: **American Association of Bovine Practitioners Proceedings of the Annual Conference**. p. 46-53, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.21423/aabppro20005359>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- OETZEL, G. R. Subacute ruminal acidosis in dairy cattle. **Advances in Dairy Technology**. v.15, p.307–317, 2003.
- OMOLE, O. O. et al. Both L-and D-lactate contribute to metabolic acidosis in diarrheic calves. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 8, p. 2128-2131, 2001.
- OSHITA, T. et al. Effects of forage type on particle size distribution of ruminal digesta and faeces of non-lactating cows fed high quality forage. **Livestock Production Science**, v. 91, n. 1-2, p. 107-115, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2004.07.015>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- OWENS, F. N. et al. Acidosis in cattle: a review. **Journal of animal science**, v. 76, n. 1, p. 275-286, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/1998.761275x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A.; MUTSVANGWA, T. Severity of ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 365-375, 2007. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72638-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72638-3)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- PENNER, G. B. et al. A single mild episode of subacute ruminal acidosis does not affect ruminal barrier function in the short term. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 10, p. 4838-4845, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3406>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- PENNER, G. B. et al. Epithelial capacity for apical uptake of short chain fatty acids is a key determinant for intraruminal pH and the susceptibility to subacute ruminal acidosis in sheep. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 9, p. 1714-1720, 2009a.



- Disponível em: <<https://doi.org/10.3945/jn.109.108506>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- PEREIRA, M. N. Responses of lactating cows to dietary fiber from alfalfa or cereal byproducts. 1997. Thesis. The University of Wisconsin, Madison, 186 p. Disponível em: <<https://www.proquest.com/openview/acd870239604cfce11aabb0b1a6d0a5a/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- PEREIRA, M. N.; ARMENTANO, L. E. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets. II. Digestion and rumen function. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2876-2887, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75188-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75188-5)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- PEREIRA, M. N. et al. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets. I. Performance and health. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 12, p. 2716-2730, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75528-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75528-1)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- PIPEROVA, L. S. et al. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 10, p. 2568-2574, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jn/130.10.2568>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- PLAIZIER, J. C. et al. Changes in microbiota in rumen digesta and feces due to a grain-based subacute ruminal acidosis (SARA) challenge. **Microbial ecology**, v. 74, n. 2, p. 485-495, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00248-017-0940-z>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- PLAIZIER, J. C. et al. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 21-31, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.016>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- PLAIZIER, J. C. et al. Review: enhancing gastrointestinal health in dairy cows. **Animal** 12: s399-s418. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S1751731118001921>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- PLAIZIER, J. C. et al. Effect of subacute ruminal acidosis on in situ digestion of mixed hay in lactating dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 81, n. 3, p. 421-423, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.4141/A00-106>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- PLAIZIER, J. C. et al. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 21-31, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.016>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- POPPI, D. P.; MINSON, D. J.; TERNOUTH, J. H. Studies of cattle and sheep eating leaf and stem fractions of grasses. 3. The retention time in the rumen of large feed particles. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 32, n. 1, p. 123-137, 1981. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/AR9810123>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- POPPI, D. P. et al. The validity of the critical size theory for particles leaving the rumen. **The Journal of Agricultural Science**, v. 94, n. 2, p. 275-280, 1980. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0021859600028859>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.

- POPPI, D. P. et al. Marker concentration patterns of labelled leaf and stem particles in the rumen of cattle grazing bermuda grass (*Cynodon dactylon*) analysed by reference to a raft model. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. 5, p. 553-563, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11348570/>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- QUMAR, M. et al. Evidence of in vivo absorption of lactate and modulation of short chain fatty acid absorption from the reticulorumen of non-lactating cattle fed high concentrate diets. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0164192, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164192>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- REIS, R. B.; COMBS, D. K. Effects of increasing levels of grain supplementation on rumen environment and lactation performance of dairy cows grazing grass-legume pasture. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 12, p. 2888-2898, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75189-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75189-7)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- REMOND, D.; ORTIGUES, I.; JOUANY, J. P. Energy substrates for the rumen epithelium. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 54, n. 1, p. 95-105, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/PNS19950040>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- RESENDE JÚNIOR, J. C. et al. Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 8, p. 3096-3106, 2006. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72584-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72584-X)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- RODRIGUES, A. C. Desempenho e digestibilidade em novilhos nelore e nelore x angus alimentados com dietas de grãos de milho inteiro e bagaço de cana. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 81 p. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ROWE, J. B. et al. No lactic acid absorbed from the caecum and rumen of sheep. **Australian journal of agricultural research**, v. 49, n. 2, p. 293-301, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/A97077>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1119-1122, 2001. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1058830>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- RUSSELL, J. B.; WILSON, D.B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. **Journal of dairy science**, v. 79, n. 8, p. 1503-1509, 1996. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76510-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76510-4)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- RUSSELL, K. E.; ROUSSEL, A. J. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, n. 3, p. 403-426, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.07.003>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- RUSTOMO, B. et al. Effects of rumen acid load from feed and forage particle size on ruminal pH and dry matter intake in the lactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 12, p. 4758-4768, 2006. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72525-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72525-5)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- NETO, A. Sá et al. Exchanging physically effective neutral detergent fiber does not affect chewing activity and performance of late-lactation dairy cows fed corn and sugarcane silages. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p. 7012-7020, 2014.

- Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2013-7856>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SALVATI, G. G. S. et al. Effect of kernel processing and particle size of whole-plant corn silage with vitreous endosperm on dairy cow performance. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 2, p. 1794-1810, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19428>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SALVATI, G. G. S. Strategies to improve kernel processing and dairy cow performance in whole-plant corn silage based on vitreous endosperm hybrid. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 83 p. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-12072019-104911/en.php>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SANTINI, F. J. et al. Proposed use of adjusted intake based on forage particle length for calculation of roughage indexes. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 4, p. 811-820, 1983. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81861-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81861-X)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SAVOIE, P. et al. Length distribution and other dimensional parameters of chopped forage by image analysis. **Transactions of the ASABE**, v. 57, n. 6, p. 1549-1555, 2014. Disponível em: <<https://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=45274>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SCHADT, I. et al. How do dairy cows chew?—Particle size analysis of selected feeds with different particle length distributions and of respective ingested bolus particles. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 8, p. 4707-4720, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2011-5118>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SCHROEDL, W. et al. A novel acute phase marker in cattle: lipopolysaccharide binding protein (LBP). **Journal of endotoxin research**, v. 7, n. 1, p. 49-52, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/09680519010070010801>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SERVA, L. et al. The relationship between dietary particle size and undegraded neutral detergent fibre in lactating dairy cows: A prospective cohort observational study. **Animal Feed Science and Technology**, v. 279, p. 115017, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115017>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SHAVER, R. D. et al. Influence of feed intake, forage physical form, and forage fiber content on particle size of masticated forage, ruminal digesta, and feces of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 6, p. 1566-1572, 1988. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79720-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79720-9)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SHI, Y.; WEIMER, P. J. Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2583-2591, 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.58.8.2583-2591.1992>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SINGH, S. S.; MURRAY, R. D.; WARD, W. R. Histopathological and morphometric studies on the hooves of dairy and beef cattle in relation to overgrown sole and laminitis. **Journal of comparative pathology**, v. 107, n. 3, p. 319-328, 1992. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0021-9975\(92\)90007-H](https://doi.org/10.1016/0021-9975(92)90007-H)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SLYTER, L. L. Influence of acidosis on rumen function. **Journal of animal science**, v. 43, n. 4, p. 910-929, 1976. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas1976.434910x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.

- SMITH, K. M.; GRANT, R. J.; OBATA, A. **Relationships between Starch and Physically Effective and Undegraded Fiber in Lactating Dairy Cows**. 2020. Disponível em: <<https://ecommons.cornell.edu/handle/1813/72887>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SMITH, W. A. et al. Effects of dietary undigested and physically effective neutral detergent fiber on dry matter intake, milk yield and composition, and chewing behavior of lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. Suppl 2, p. 350, 2018.
- STEELE, M. A. et al. Development and physiology of the rumen and the lower gut: Targets for improving gut health. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 6, p. 4955-4966, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10351>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- STEELE, M. A. et al. Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, n. 6, p. R1515-R1523, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00120.2010>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- STEELE, M. A. et al. Ruminal acidosis and the rapid onset of ruminal parakeratosis in a mature dairy cow: a case report. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, n. 1, p. 1-6, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-39>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- STONE, W. C. Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 87, p. E13-E26, 2004. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70057-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70057-0)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- STORM, A. C.; KRISTENSEN, N. B. Effects of particle size and dry matter content of a total mixed ration on intraruminal equilibration and net portal flux of volatile fatty acids in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 9, p. 4223-4238, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2009-3002>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SUDWEEKS, E. M. et al. Assessing minimum amounts and form of roughages in ruminant diets: roughage value index system. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 5, p. 1406-1411, 1981. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/jas1981.5351406x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- SWAIN, S. M.; ARMENTANO, L. E. Quantitative evaluation of fiber from nonforage sources used to replace alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 8, p. 2318-2331, 1994. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77175-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77175-7)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- TAF AJ, M. et al. Digesta characteristics of dorsal, middle and ventral rumen of cows fed with different hay qualities and concentrate levels. **Archives of Animal Nutrition**, v. 58, n. 4, p. 325-342, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00039420412331273259>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- TAJIMA, K. et al. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. **Anaerobe**, v. 6, n. 5, p. 273-284, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/anae.2000.0353>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- TAMMINGA, S.; VAN VUUREN, A. M. Formation and utilization of end products of lignocellulose degradation in ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 21, n. 2-4, p. 141-159, 1988. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0377-8401\(88\)90096-X](https://doi.org/10.1016/0377-8401(88)90096-X)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.

- TAO, S. et al. High concentrate diet induced mucosal injuries by enhancing epithelial apoptosis and inflammatory response in the hindgut of goats. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e111596, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111596>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- TURNER, A. W.; HODGETTS, V. Elizabeth. Buffer systems in the rumen of sheep. II. Buffering properties in relationship to composition. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 1, p. 125-144, 1955. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/AR9550125>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- J Uribarri, MS Oh, HJ Carroll
- URIBARRI, J.; OH, M. S.; CARROLL, H. J. D-lactic acidosis: a review of clinical presentation, biochemical features, and pathophysiologic mechanisms. **Medicine-Baltimore**, v. 77, p. 73-82, 1998. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Jaime-Uribarri/publication/13723050\\_D-lactic\\_acidosis\\_A\\_review\\_of\\_clinical\\_presentation\\_biochemical\\_features\\_and\\_pathophysiologic\\_mechanisms/links/0912f50b0dd57b8333000000/D-lactic-acidosis-A-review-of-clinical-presentation-biochemical-features-and-pathophysiologic-mechanisms.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jaime-Uribarri/publication/13723050_D-lactic_acidosis_A_review_of_clinical_presentation_biochemical_features_and_pathophysiologic_mechanisms/links/0912f50b0dd57b8333000000/D-lactic-acidosis-A-review-of-clinical-presentation-biochemical-features-and-pathophysiologic-mechanisms.pdf)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- URRUTIA, N. L.; HARVATINE, K. J. Acetate dose-dependently stimulates milk fat synthesis in lactating dairy cows. *The Journal of nutrition*, v. 147, n. 5, p. 763-769, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3945/jn.116.245001>>. Acesso em: 05 de mai. de 2022.
- VAIR, C. et al. Influence of sodium salts of volatile fatty acids on rumen development in the young calf. **Journal of Dairy Science**, v. 43, n. 6, p. 890-91, 1960. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19600403185>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- VAN SOEST, P. J. Ruminant fat metabolism with particular reference to factors affecting low milk fat and feed efficiency. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 46, n. 3, p. 204-216, 1963. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(63\)89008-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(63)89008-6)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- VERHEIDEN, J. H. M. et al. De pathogenese van coliforme mastitis. *Tijdschrift v. Diergeneeskunde*, v.106, p.501-507, 1981. Disponível em: <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XE8181262>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- VON ENGELHARDT, W.; HAUFFE, R. Funktionen des Blättermagens bei kleinen Hauswiederkäuern: IV. Resorption und Sekretion von Elektrolyten 1. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A**, v. 22, n. 5, p. 367-375, 1975. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1975.tb01442.x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- WALTER, A.; GUTKNECHT, J. Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. **The Journal of membrane biology**, v. 90, n. 3, p. 207-217, 1986. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF01870127>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- WANG, Y.; MCALLISTER, T. A. Rumen microbes, enzymes and feed digestion-a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 15, n. 11, p. 1659-1676, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.5713/ajas.2002.1659>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- WASSELL, J. Haptoglobin: function and polymorphism. **Clinical laboratory**, v. 46, n. 11-12, p. 547-552, 2000. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/11109501>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.

- WEBEL, D. M. et al. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. **Journal of animal science**, v. 75, n. 6, p. 1514-1520, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.2527/1997.7561514x>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- WEIDNER, S. J.; GRANT, R. J. Altered ruminal mat consistency by high percentages of soybean hulls fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 2, p. 522-532, 1994. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)76980-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)76980-0)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- WELCH, J. G. Rumination, particle size and passage from the rumen. **Journal of animal science**, v. 54, n. 4, p. 885-894, 1982. Disponível em: <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19830864816>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- WELCH, J. G.; SMITH, A. M. Forage quality and rumination time in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 6, p. 797-800, 1970. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86293-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86293-2)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- WHITE, R. R. et al. Physically adjusted neutral detergent fiber system for lactating dairy cow rations. I: Deriving equations that identify factors that influence effectiveness of fiber. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 12, p. 9551-9568, 2017a. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12765>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- WHITE, R. R. et al. Physically adjusted neutral detergent fiber system for lactating dairy cow rations. II: Development of feeding recommendations. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 12, p. 9569-9584, 2017b. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12766>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- WOODFORD, S. T.; MURPHY, M. R. Effect of forage physical form on chewing activity, dry matter intake, and rumen function of dairy cows in early lactation. **Journal of dairy science**, v. 71, n. 3, p. 674-686, 1988. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79606-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79606-X)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- WOODFORD, S. T. et al. Ruminal bypass of drinking water in lactating cows. **Journal of dairy Science**, v. 67, n. 10, p. 2471-2474, 1984. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81599-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81599-4)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- WOODFORD, J. A.; JORGENSEN, N. A.; BARRINGTON, G. P. Impact of dietary fiber and physical form on performance of lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 69, n. 4, p. 1035-1047, 1986. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80499-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80499-4)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- YANG, H. et al. Subacute ruminal acidosis phenotypes in periparturient dairy cows differ in ruminal and salivary bacteria and in the in vitro fermentative activity of their ruminal microbiota. **Journal of Dairy Science**, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2021-21115>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Barley processing, forage: concentrate, and forage length effects on chewing and digesta passage in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 12, p. 2709-2720, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74725-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74725-X)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ZEBELI, Q.; HUMER, E. An update of particle size and effective NDF in maize silage-based rations. In: **Proc. V International Symposium on Forage Quality and Conservation**. FEALQ, Piracicaba, SP, Brazil, 2017. p. 21-39. Disponível em: <<http://www.isfqcbrazil.com.br/proceedings/2017/an-update-of-particle-size-and>>

- effective-ndf-in-maize-silage-based-rations-159.pdf>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ZEBELI, Q. et al. Invited review: Role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v.95, p.1041-1056, 2012a. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2011-4421>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ZEBELI, Q. et al. A model to optimise the requirements of lactating dairy cows for physically effective neutral detergent fibre. *Archives of animal nutrition*, v.64, n.4, p.265–278, 2010a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1745039X.2010.486603>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ZEBELI, Q. et al. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet. *Journal of dairy science*, v. 91, n. 5, p. 2046-2066, 2008a. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0572>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ZEBELI, Q. et al. Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: A key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle. *Livestock Science*, v. 127, n. 1, p. 1-10, 2010b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.09.003>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ZEBELI, Q.; METZLER-ZEBELI, B. U.; AMETAJ, B. N. Meta-analysis reveals threshold level of rapidly fermentable dietary concentrate that triggers systemic inflammation in cattle. *Journal of dairy science*, v. 95, n. 5, p. 2662-2672, 2012b. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2011-5080>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ZEBELI, Q.; DUNN, S. M.; AMETAJ, B. N. Perturbations of plasma metabolites correlated with the rise of rumen endotoxin in dairy cows fed diets rich in easily degradable carbohydrates. *Journal of dairy science*, v. 94, n. 5, p. 2374-2382, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3860>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ZEBELI, Q. et al. Evaluation of the response of ruminal fermentation and activities of nonstarch polysaccharide-degrading enzymes to particle length of corn silage in dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 91, n. 6, p. 2388-2398, 2008b. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0810>>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.
- ZEBELI, Q. et al. Effects of physically effective fiber on digestive processes and milk fat content in early lactating dairy cows fed total mixed rations. *Journal of dairy science*, v. 89, n. 2, p. 651-668, 2006. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72129-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72129-4)>. Acesso em: 05 de jan. de 2022.

### III OBJETIVO GERAL

Avaliar a efetividade física de frações da silagem de milho estratificadas com o separador de partículas da Penn State para vacas em lactação.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar alterações no comportamento ingestivo, consumo de nutrientes e cinética ruminal causadas pelas frações da silagem de milho estratificadas pelo conjunto de peneiras da Penn State;

Examinar a influência das frações de partículas da silagem de milho na digestibilidade de nutrientes, no *clearance* de ácidos graxos voláteis no ruminorretículo e na síntese de proteína microbiana;

Mensurar o efeito das frações de partículas na produção e na composição do leite;

Identificar possíveis alterações em metabólitos sanguíneos relacionados à ocorrência de acidose ruminal de acordo com a inclusão das partículas nas dietas;

Gerar coeficientes de efetividade física de FDN para cálculo de FDN<sub>fe</sub> da silagem de milho utilizando o conjunto de peneiras PSPS.



## **IV Physical effectiveness of corn silage fractions stratified with the Penn State particle separator for lactating dairy cows**

(Manuscript style and form consistent with the Instructions for Authors of the Journal of Dairy Science)

### **ABSTRACT**

The aim of this study was to examine the physical effectiveness of corn silage (CS) particles stratified with the Penn State particle separator (PSPS) for lactating cows. Eight lactating Holstein cows ( $27.6 \pm 2.77$  kg of milk,  $611 \pm 74$  kg BW;  $152 \pm 83$  DIM) were allocated in two  $4 \times 4$  balanced-Latin squares. Four rumen cannulated cows composed one Latin square and four intact cows composed the other (16 days of adaptation and 6 days of collections). The particles were stratified using PSPS devices (2-sieve model) and stored in 200-L drums for 60 d. The four experimental diets were as follows: 1) CON (control): 17% forage NDF (fNDF) from whole-plant CS; 2) <8: 17% fNDF from whole-plant CS + 9% NDF from CS particles <8 mm; 3) 8-19: 17% fNDF from whole-plant CS + 9% NDF from CS particles within 8-19 mm; 4) >19: 17% fNDF from whole-plant CS + 9% NDF from CS particles >19 mm. The remainder of the diet consisted of reconstituted corn grain silage, dry ground corn grain, soybean hulls, soybean meal, sodium bicarbonate, magnesium oxide, and mineral-vitamin mix. Data were analyzed with a model including a random effect of cow(square), and fixed effects of square, period, and treatment. Ruminal fermentation outcomes were analyzed as repeated measures over time. The CN diet decreased DM intake, chewing time, ruminal in situ disappearance (24 h) of DM and NDF of CS, ruminal pH, total-tract apparent digestibility, 3.5% FCM, milk fat content and yield, and MUN, whereas increased rumen lactate and plasma LPS when compared with diets containing CS fractions. Hence, animals receiving CON were in SARA. Among CS fractions, shorter chewing time (659 vs 718 min/d), lower milk fat yield (0.901 vs 0.962 kg/d) and higher blood lipopolysaccharide (LPS) concentration (0.173 vs 0.031 EU/mL) were found for CS <8 mm compared with CS with 8-19 mm. The CS with 8-19 mm had greater DM intake (22.4 vs 21.2 kg/d), chewing time (718 vs 657 min/d), rumen VFA (104 vs 91.7 mM), milk (26.8 vs 24.8 kg/d), fat (0.962 vs 0.889 kg/d) and protein (0.873 vs 0.798 kg/d) yields than the CS >19 mm. Blood concentrations of D-lactate and serum amyloid A were similar among CS fractions. No differences were found between CON and CS fractions for rumen fluid kp and pool, valerate ka and kc, however, there was a trend towards lower relative efficiency of microbial protein synthesis based on urinary purine derivatives when compared to CS fractions. The NDF of CS >19 mm was less effective than CS 8-19 mm, due to the sorting behavior against particles >19 mm, NDF, and uNDF, and in favor of starch, therefore, this fraction should be considered with caution when estimating peNDF for dairy cows.

**Key words:** bioassay, particle size, physical effectiveness factor

## INTRODUCTION

Dairy nutritionists currently face a challenge to maintain high productivity without compromising rumen health. To meet the high nutritional requirements during lactation, dairy TMR often contain large amounts of concentrates, which may compromise the physically effective fiber content (peNDF). The peNDF is needed to stimulate chewing and saliva production, promote rumen mat formation, and stimulate rumen motility (Allen, 1997; Zebeli et al., 2012a; Humer, et al., 2018), decreasing the risk of subacute ruminal acidosis (SARA). Despite the benefits of peNDF with longer forage particles to maintain rumen function, excess peNDF can limit DMI and performance (Zebeli et al., 2009).

Mathematically, the peNDF is the product of the physical effectiveness factor (pef) by the NDF content, representing the integration of chemical and physical factors of the feed (Mertens, 1997). The NDF is determined by chemical analysis, while the pef can be measured from animal responses (Armentano and Pereira, 1997) or sieving methods, based on the fractions of feed retained on a set of sieves (Mertens, 1997).

The Penn State Particle Separator (PSPS) was initially proposed by Lammers et al. (1996), composed of 19 mm, 8 mm sieves and pan, however, other versions have emerged, with the addition of a 1.18 mm (Kononoff et al., 2003) or 4 mm sieve (Heinrichs, 2013), however, many nutritionists still use the first version (2-sieve model). However, to the best of our knowledge, the pef of NDF from fractions retained on each PSPS sieve is unknown, while integrating the PSPS with pef based on animal responses would be a tool to improve precision nutrition.

Whole-plant corn silage (CS) is the main preserved forage used in dairy farms worldwide, and in most diets, CS is the main source of peNDF. Therefore, the aim of this study is to determine the pef of corn silage fractions stratified with the PSPS for dairy cows. We hypothesized that the NDF from particles >19 mm has equal or lower pef than the NDF from particles with 8-19 mm due to the comminution of particles before swallowing (Schadt et al., 2012) and the greater risk of sorting against long particles (McCarthy et al., 2018). Despite the smaller particle size, NDF of particles <8 mm may have some physical effectiveness.

## MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out at the Iguatemi Experimental Farm, State University of Maringá, Maringá, Brazil. Animal care and handling procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Use of the State University of Maringá (protocol number 4552250920).

### *Animals and Treatments*

Eight lactating Holstein cows ( $611 \pm 74$  kg BW;  $152 \pm 83$  DIM) were assigned to two  $4 \times 4$  balanced-Latin squares, with 22 d periods (16 d for adaptation and 6 d for sampling). Four rumen cannulated cows composed one Latin square and four intact cows composed the other. Cows were housed in a tie-stall barn bedded with wood shavings, individual feedbunk and water trough. Cows were milked in a milking parlor at 0630 and 1530 h.

The four experimental diets were as follows: 1) CON (control): 17% forage NDF from CS (basal roughage); 2) <8: 17% forage NDF from CS + 9% NDF from CS particles <8 mm stratified with the PSPS; 3) 8-19: 17% forage NDF from CS + 9% NDF from CS particles 8-19 mm stratified with the PSPS; 4) >19: 17% forage NDF from CS + 9% NDF from CS particles >19 mm stratified with the PSPS.

Corn plants were harvested at 1/2 milk-line stage (approximately 35% DM), with a pull-type forage harvester set for chopping a theoretical length of cut of 10 mm and with a kernel processor device (New Pecus, Nogueira, São João da Boa Vista, Brazil), and stored in two bunker silos for at least 245 d. The CS from one bunker was manually stratified in different particle sizes (<8 mm, 8-19 mm, and >19 mm) using three sets of PSPS (2-sieve model; Lammers et al., 1996). Each CS fraction (>19 mm, 8-19 mm and <8 mm) were manually reensilaged in 200-L plastic drums for 2 mo before starting the trial. In each working day, the material was segregated until the drum was completed, so the stratification, packing and sealing processes took place on the same day. The CS used as basal roughage was feedout from the other bunker silo. Concentrates consisted of reconstituted corn grain silage (rolled, stored for 145 d before feeding), dry ground corn grain, soybean meal, soybean hulls, sodium bicarbonate, magnesium oxide, and mineral-vitamin mix. The TMR ingredients were mixed manually twice daily, immediately before each feeding at 0800 and 1400 h, in amounts approximately 5-10% in excess of daily intake. The DM content of the CON diet was adjusted by water addition.

### ***Data collection and sampling***

Feeding behavior was visually monitored by trained evaluators on d 17 and d 18 of each period, by visual assessment of each animal every 5 min, during a consecutive period of 48 h. Eating, ruminating, chewing (eating + ruminating), meals per day, duration of first meal, meal size, meal length, meal interval and eating rate were recorded. Individual feeding observations were combined and separated into meals using a meal criterion calculated for each cow, using methods described by DeVries et al. (2003). The meal criterion was defined as the longest nonfeeding interval considered to be part of a meal, where, meal frequency is dependent upon meal criterion, such that small meal criterion results in more frequent daily meal events (Bailey et al. 2015). If the interval of time between 2 recorded observations of eating exceeded the determined meal criterion, this was classified as a different meal, and the number of different meals in a day was termed meal frequency (meals/d). Total meal time (min/d) was the total eating time (eating observations/d  $\times$  5 min), plus all the non-feeding intervals shorter than the length of the meal criterion of each cow.

Dry matter intake (DMI) was measured from d 17 to 22 of each experimental period, as the difference between the amount of DM offered and the DM refused. Feeds and orts were collected and analyzed to estimate the chemical composition of the diet consumed. Samples were composite per cow per period and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for subsequent analysis.

To determine the particle sorting index (PSI), offered TMR and individual orts were sampled on d 17, d 19, and d 21 and particle size distribution was measured using the PSPS (2-sieve model; Lammers et al., 1996). The PSI was calculated for fresh matter, DM, NDF, and uNDF, where values  $<100\%$  indicate selective refusal, those  $>100\%$  indicate preferential consumption, and those equal to  $100\%$  indicate no sorting (Leonardi and Armentano, 2003). During data collection, 7.89% of oarts were obtained.

Milk yield was recorded from d 17 to 22. Milk samples were collected from d 17 to 20 each period (eight consecutive milkings). Milk samples preserved in bronopol (40 mL) were analyzed for fat, protein, lactose, MUN, and SCC by APCBRH (Curitiba, Brazil) using mid-infrared spectroscopy (Nexgen FTS/FCM, Bentley Instruments Inc., Chaska, USA). 3.5%-FCM was calculated as:  $[(0.4324 \times \text{kg of milk yield}) + (16.216 \times \text{kg of milk fat})]$ . Milk energy secretion (Mcal/d) was calculated as:  $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{milk yield (kg/d)}$  (NRC, 2001). Energy-

corrected milk (ECM; kg/d) was calculated as milk energy secretion divided 0.70 (i.e., assumes 0.70 Mcal/kg of milk).

On d 18 of each period, dried but not ground CS fractions (<8, 8-19 and >19 mm) marked with Cr mordant (Udén et al., 1980) were infused into the rumen to estimate the fractional rate of passage. Each animal received the respective fiber source present in the diet. Mordant fiber was infused in pulse dose (100 g) directly into the rumen via cannula. Fecal grab samples were collected at the following times: 24, 32, 40, 48, 56, 64 and 72 h after marker administration.

At the beginning and at the end of each period (after morning milking), the animals were weighed. The BCS (1-5; Wildeman et al. 1982) was recorded by three trained persons. Fecal consistency score was recorded on d 17-20 after each feeding by three trained evaluators (Litherland, 2007; Looper et al., 2001). Fecal samples were collected every 8 h from d 18 to 21 (total of 12 samples) and stored at -20 °C. In each sampling day, the collection was delayed by 2 h to represent the 24 h of the day. Samples were pooled to form one composite sample per animal per period.

Ruminal fluid was collected from cannulated cows on d 19 at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 and 24 h after morning feeding. Samples of approximately 100 mL of rumen fluid was obtained from the ventral sac by a perforated tube coupled to a suction device. The pH was measured immediately with a pHmeter (Tec5, Tecnal) and samples (5 x 2 mL) were frozen at -80°C for determination of VFA. The ruminal pH of 5.8 was chosen as the reference for SARA (Russell and Wilson, 1996; Gozho et al., 2007; Beauchemin et al., 2003).

Ruminal mat consistency was assessed 4 h after morning feeding on d 20. A 454-g metal weight attached to a rope was inserted into the rumen ventral sac, through the cannula and through the floating digesta layer, 2 h before measurement. After the period of reconstitution of the mat ruminal (2 h), the outer end of the rope was fixed to a weight of 1362 g. The rope slides between pulleys attached to the ends of a graduated wood rod (Welch, 1982). Then, the time taken to rise the internal weight to the upper point of the floating layer and the vertical displacement were registered. Inner weight ascent rate (cm/min) was calculated by dividing the displacement by the time it took for the inner weight to cross the ruminal mat. The distance traveled by the internal weight ( $\cong$  mat thickness) was also recorded.

Rumen digesta was manually evacuated through the ruminal cannula on the d 21 of each period, at 1-h before the morning feeding and 8 h after the morning feeding.

During evacuation, rumen digesta was transferred to an isothermal box, and subsequently weighed. For every ten parts of evacuated rumen digesta, one was separated to obtain a representative sub-sample. A homogeneous sub-sample was dried in an oven at 55 °C for 72 h to determine the DM, NDF, uNDF content and the distribution of particles in a vertical shaker (Ro-Tap). On d 21, after the rumen evacuation (1-h before morning feeding) and while the rumen still empty, the experimental TMR were offered and animals were allowed to eat during 20 min. Immediately after this period, particles of freshly swallowed bolus were collected directly from the rumen, and dried in a forced ventilation oven (55 °C for 72 h). Particle size distribution of the swallowed bolus was determined by dry sieving with a vertical shaker (Ro-Tap). On d 21, a solution (1.5 L; pH = 6.5) containing valerate (250 mL; Dinâmica química Contemporânea Ltda) and Cr-EDTA (1000 mL; Binnerts et al., 1968) was homogenized to the evacuated digesta during the rumen evacuation. Rumen fluid was collected at 0, 0.5, 1, 2 and 4 h, after rumen content was returned to the rumen, for determination of VFA and Cr. The TMR and water were withdrawn during the 4-h sampling (Resende Junior et al., 2006). The rumen fluid volume (L) was calculated by multiplying the wet weight by the percentage of moisture (Resende Junior, 2006). The DM pool was calculated by multiplying the wet weight by the DM content, while the NDF and uNDF pools were obtained by multiplying the DM pool by the NDF and uNDF contents. Fractional turnover rate of ruminal DM and fractional passage rate uNDF were calculated as follows: DM fractional turnover rate (%/h) =  $100 \times [\text{intake of DM (kg)/ruminal pool of DM (kg)}/24]$ ; and uNDF fractional passage rate (%/h) =  $100 \times [\text{intake of uNDF (kg)/ruminal pool of uNDF (kg)}/24]$ .

On d 22, dacron bags (10 x 20 cm; 50 µm porosity; 15 mg/cm<sup>2</sup>) containing dry and ground samples (5 mm) of whole-plant CS (in all animals) or fiber source (CS <8 mm, CS 8-19 mm and CS >19 mm, in their respective treatment) were placed in the rumen ventral sac of cannulated cows for 24 h to verify the possible side effects of treatment on the ruminal degradation of DM and NDF.

On d 22 of each period, blood samples were collected from the external jugular vein at 8 h after morning feeding in vacuum tubes. Plasma from tubes with EDTA and serum from tubes without anticoagulant were separated by centrifugation at 2,500 ×g at 4° C for 15 min and frozen at -80 °C for analyses of blood metabolites.

Urine samples were collected between 4 and 6 h after morning feeding on d 22 for analyzes of creatinine, allantoin and uric acid. After filtering through 2 layers of cheesecloth, a 10 mL aliquot was diluted in 40 mL of 0.036 N sulfuric acid for

determination of allantoin and a second undiluted aliquot for determination of creatinine and uric acid.

### ***Laboratory analysis***

Samples of feeds, TMR, Orts, and feces were dried for 72 h in an oven at 55°C and ground in a Wiley type mill (Marconi MA340) with a 1-mm pore sieve. Samples were analyzed for absolute DM (method 930.15; AOAC, 2000), ash (method 942.05; AOAC, 2000), CP (method 984.13; AOAC, 2000) and ether extract (method 920.29; AOAC, 1990). The OM was calculated as 100 – ash. The NDF was assayed using filter bags (F57, Ankom) and a neutral detergent solution including thermostable amylase and sodium sulfite (Mertens, 2002; method 2002.04). Acid detergent fiber (ADF) and acid detergent lignin (ADL) were analyzed according to Van Soest (1973; method 973.18). Total starch (measured as starch + free glucose) content of feces, Orts, ingredients and TMR was determined enzymatically using a commercial assay kit (K-TSTA-100A, Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Ireland; method 996.11, AOAC, 2007). The NFC (%) was calculated as 100 - CP - NDF - ether extract - ash. Undigested NDF (uNDF) was determined by 288 h of in situ ruminal incubation (Huhtanen et al., 1994). Total-tract apparent digestibility was measured using uNDF as an internal marker, with measurement of ingredients, TMR, Orts, and feces (Huhtanen et al., 1994). Digestibility was calculated using intake data recorded on days of fecal sampling.

The distribution of particles of RCGS and CG were measured in dried samples using a horizontal shaker (Ro-Tap; Solotest, São Paulo, Brazil). Approximately, 120 g of dry sample was shaken for 10 min. The geometric mean particle size (GMPS) and geometric standard deviation (GSD) of corn grain and reconstituted corn grain silage were calculated according to ASABE (2008; method S319.4). Corn silage processing score (% starch passing through a 4.75-mm sieve size distribution) was measured in dried samples using a horizontal shaker (Ferreira and Mertens, 2005).

Actual particle sizes of fiber sources (CS <8 mm, 8-19 mm and >19 mm) were measured using a flatbed scanner. Fiber source samples (8 samples per fiber source, > 400 particles measured per subsample, total of >3200 particles measured per fiber source) and a 1-cm reference scale were digitalized, and particle sizes were measured manually using the ImageJ software (ImageJ 1.8.0\_172, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Particles larger than 50 mm were measured with a ruler.

The blood metabolites were analyzed using commercial kits for plasma glucose (Glicose PP, Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte, Brazil), plasma urea (Ureia PP, Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte, Brazil), serum NEFA (NEFA VET, BioTécnica Ltda, Varginha, Brazil), plasma lipopolysaccharide (Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit, ThermoFisher Scientific, Rockford, USA), serum amyloid A (PHASE™ Serum Amyloid A Assay - Multispecies, Tridelta Development Limited, Maynooth, Ireland), and serum D-lactate (D-Lactate Colorimetric Assay Kit, Elabscience, Houston, USA).

Uric acid and creatinine concentrations in urine were determined using commercial kits (uric acid PP and creatinine PP, respectively; Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte, Brazil). Allantoin concentration was determined according to Chen and Gomes (1992). The ratios allantoin:creatinine, uric acid:creatinine and (allantoin+uric acid):creatinine multiplied by BW were calculated as proxies of microbial protein synthesis (Hristov et al., 2019). The relative efficiency of microbial protein synthesis was calculated as follows:  $[(\text{purine derivatives} / \text{creatinine}) \times \text{BW}] / \text{intake of digestible organic matter}$ .

After thawing, rumen fluid was centrifuged at  $2,000 \times g$  for 15 min at 4 °C to obtain the supernatant. The VFA were determined by gas chromatography (Del Valle, 2018), whereas  $\text{NH}_3$  (Chaney and Marback, 1962) and lactate (Pryce, 1969) were analyzed by colorimetric methods. Chromium concentration was determined by inductively coupled plasma–mass spectrometry. The  $k_p$  of rumen fluid was calculated as the slope of the natural log of Cr concentration plotted against the time. Fractional clearance rate ( $k_c$ ) of valerate was calculated as the slope of the natural log of valerate concentration plotted against the time. Fractional absorption rate ( $k_a$ ) of valerate was calculated as  $k_c - k_p$  (Resende Júnior et al., 2006).

Fecal Cr concentration was determined by inductively coupled plasma–mass spectrometry. Feces were ashed overnight in a muffle furnace at 450 °C and digested with sulfuric acid + perchloric acid before the reads (Fenton e Fenton, 1979). Fractional passage rates of fiber sources were calculated by as the slope of the natural log of marker concentration (during the descending phase of concentration) plotted against the time. Data points that preceded the peak concentration time were deleted, as well the asymptotic portion of the marker excretion curve was deleted (Reis and Combs, 2000).



### ***Pef calculation***

Based on different animal responses, pef were calculated for CS fractions using the slope ratio approach (Armentano and Pereira, 1997). The increase in a given response per increase in NDF percentage from CS <8 mm or CS >19 mm (assuming a linear response) was divided by the slope estimates for the CS with 8-19 mm (pef relative to middle screen [8 mm] set to 1). Variables were chosen to represent different animal compartments (i.e., time spent ruminating per kilogram of DMI, mat consistency measured as the inverse of distance traveled in min 1 (cm), rumen pH measured as the inverse of duration of ruminal pH <5.8 (h/d), and blood concentration of LPS).

### ***Statistical analysis***

Data were analyzed using the Mixed procedure of SAS (v. 9.4, SAS Inst. Inc., Cary, CON) with the following model:  $Y_{ijkl} = \mu + S_i + C(S)_{ij} + P_k + T_l + e_{ijkl}$ , where:  $Y_{ijkl}$  = dependent variable,  $\mu$  = overall mean,  $S_i$  = fixed effect of Latin square ( $i = 1$  or  $2$ ),  $C(S)_{ij}$  = random effect of cow nested within Latin square ( $j = 1$  to  $8$ ),  $P_k$  = fixed effect of period ( $k = 1$  to  $4$ ),  $T_l$  = fixed effect of treatment ( $l = 1$  to  $4$ ), and  $e_{ijkl}$  = residual error, assumed independently and identically distributed in a normal distribution with mean zero and variance  $\sigma^2$ . Ruminal fermentation data were analyzed as repeated measures over time. The effect of Latin square effect was deleted, whereas the effect of time and its interaction with fiber source was added in the model. The effect of cow nested within treatment was used as an error term. The following covariance structures were tested: variance components (VC), compound symmetry (CS), first-order autoregressive (AR(1)), and unstructured (UN). The covariance structure with the lowest value for the corrected Akaike information criterion was retained in the final model for each variable. Significant differences were declared at  $P \leq 0.05$  and tendencies to significance at  $0.05 < P \leq 0.10$ . Descriptive statistics were computed for particle size measured with image analysis, and data were presented in histograms.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The chemical composition and particle size of ingredients and experimental diets are shown in Table 1, 2 and 3. Diets were isonitrogenous and attempt was made to balance the proportion of ensiled starch (more degraded in the rumen than dry starch) among diets. We replaced NDF from CS <8 mm with NDF from other CS fractions by adding RCGS

to obtain rumen-degradable iso-starch diets. The CON treatment showed greater inclusion of ground dry corn grain than the other treatments.

Particle size distribution of experimental diets reflected the inclusions of the respective CS fractions, whose differences of particle size were more noticeable for the PSPS than dry sieving. Compared with the PSPS, dry sieving promoted a displacement of particles from the 8-mm sieve to the 1.18-mm sieve and pan. Such divergence between sieving methods was likely due to the differences in moisture content (as fed vs. dry sample), fragmentation of dry particles during handling, and type of agitation method, hole shape and thickness of screens (PSPS vs. Ro-Tap).

Frequency distribution of actual particle lengths of CS fractions, measured with a scanner, are presented in Supplemental Figures. The CS fraction passing through the 8-mm sieve (pan) had sizes ranging from 1 to 11 mm, with a greater proportion of particles between 1 and 8 mm, mean (4.67 mm), mode (4.50 mm), and median (4.40 mm) (Supplemental Figure S1). The CS fraction retained on the 8-mm sieve showed the highest proportion of particles between 5 and 30 mm, with mean = 13.2 mm, mode = 10.0 mm, and median = 11.5 mm (Supplemental Figure S2). The presence of particles longer than the sieve pore is because of long and narrow particles can tip over during agitation and slide through holes smaller than the longest particle dimension (Igathinathane et al., 2009). When particles are nearly square or round, the tilting phenomenon does not occur. However, when the particles are oblong, the sieves tend to retain particles whose second longest dimension (width) is greater than the diagonal of the sieve hole (Igathinathane et al., 2009; Savoie et al., 2014). The CS fraction retained on the 19-mm sieve showed mean = 37.9 mm, mode = 30.0 mm, and median = 30.0 mm (Supplemental Figure S3). The large range found for CS >19 mm (1 to 175 mm) was due to the occurrence of extreme sizes. The presence of large particles (mainly husks) is usual in CS chopped with pull-type forage harvesters (Daniel et al., 2019), whereas small particles can adhere to long particles and remain on the 19-mm sieve during as fed sieving.

### ***Milk yield and composition***

Cows fed CON showed lower FCM, milk fat (%), solids (%), and MUN (mg/dL) and a tendency of lower ECM and higher protein (%) when compared to CS fractions (Table 4). The lower milk fat content observed for CON is consistent with the literature, as diets with lower NDF content often induce milk fat depression (Swain and Armentano, 1994; Clark and Armentano, 1999; Piperova et al., 2000). A possible

mechanism for reducing milk fat involves the accumulation of ruminal FA biohydrogenation intermediates that may inhibit fat synthesis in the mammary gland (Griinari et al., 1998). Under low rumen pH conditions, PUFA are only partially biohydrogenated, which produces bioactive FA, such as *trans*-10, *cis*-12 CLA, and *trans*-10 18:1, resulting in reduced milk fat (Griinari et al., 1998; Colman et al., 2010; Dewanckele et al. 2020).

The lower MUN for CON is in line with the findings of Gao and Oba (2014), who also reported lower MUN for animals with SARA. The higher N fixation under intense fermentation conditions (Nocek and Russell, 1988), and the higher net inflow of urea to the rumen under lower ruminal pH conditions, are possible reasons for lower MUN (Lu et al., 2014).

Among CS fractions, the CS <8 mm induced less milk fat yield (kg/d) and a trend towards lower ECM, FCM, and milk fat %, in comparison with the CS with 8-19 mm. The CS with 8-19 mm also had higher milk yield, ECM, FCM, milk fat (kg/d), and protein (kg/d) yields compared to CS >19 mm. Such responses were likely a combination of greater DMI and optimal ruminal conditions promoted by CS with 8-19 mm.

### ***Nutrient intake, chewing behavior, and meal behavior***

Compared with diets containing CS fractions, the CON diet resulted in lower DMI, NDF intake, uNDF intake, eating time (min/kg DM), ruminating time (min/d, min/kg DM), chewing time (min/d, min/kg DM), meal frequency, and greater starch intake, eating time (min/kg uNDF), ruminating time (min/kg uNDF), chewing time (min/kg uNDF), meal interval (min), and meal size (kg DM/meal, kg starch/meal) (Table 5). The CON treatment induced a greater proportion of propionate. Propionate is capable of increasing Krebs cycle anaplerosis in hepatocytes, signaling the satiety center to regulate DMI (Allen et al., 2009). Also, adverse conditions in the ruminal digesta induced by the lack of fiber (i.e., SARA discussed below) might have contributed to lower DMI (Nocek, 1997; Krajcarski-Hunt et al. 2002; Khafipour et al., 2009a). The CON decreased chewing time compared to diets containing CS fractions, which might have reduced the flow of saliva entering the rumen and consequently the supply of buffer (Maekawa et al., 2002).

An increase in forage content, with different particle sizes, often increases rumination and total chewing time (Clark and Armentano, 1999). In our trial, CS fractions were capable of promoting eating and ruminating time. However, the response was

dependent on the CS fraction. Shorter chewing time (min/d, min/kg DM, min/kg NDF, min/kg uNDF), NDF>8 mm intake (kg/d), and a trend of lower DMI, NDF intake, ruminating time (min/d, min/kg DM, min/kg NDF, min/kg uNDF), and higher min/kg NDF >8 mm eating, ruminating, chewing, were found for CS <8 mm compared with CS with 8-19 mm. On the other hand, the CS >19 mm decreased DMI, NDF intake, uNDF intake, starch intake, eating (min/kg NDF >19 mm), ruminating (min/kg NDF >19 mm) and chewing time (min/d, min/kg NDF >19 mm), and higher meal interval (min), and tended to reduce NDF>8 mm intake (kg/d), eating time (min/d), ruminating time (min/d), meal frequency (meals/d), and meal time (min) compared to CS with 8-19 mm. Schwab et al. (2012) also found that increasing the theoretical length of cut (13, 19, and 32 mm) of CS reduced the DMI in lactating dairy cows, likely due to rumen fill. At a lower DMI, the CS >19 mm led to the same pool of uNDF, greater pool of DM >19 mm and tended to increase the pool of DM with 8-19 mm in the rumen. Starch intake was lower for the CS >19 mm compared with the CS with 8-19 mm. Therefore, the CS >19 mm might have depressed DMI by physical fill (Allen, 2000). Interestingly, uNDF intake ( $\cong 0.30$  % of BW for diets with CS fractions) was lower than the threshold reported to limit feed intake in dairy cows fed corn-silage based diets (0.35-0.40% BW; Cotanch et al., 2014). It suggests that intake regulation by physical fill is driven by a combination of NDF, uNDF and particle size.

A shorter chewing time for the CS <8 mm was expected due to the smaller particle size either offered or swallowed, as the lack of coarse material in the rumen reduces masticatory activity (Balch et al., 1955; Sudweeks et al., 1980). Moreover, dissimilar DMI among diets might have contributed for differences in chewing time. Regardless, NDF of CS <8 mm showed some ability to stimulate rumination, indicating that its physical effectiveness should not be completely neglected. On the other hand, NDF of particles retained on the 19-mm sieve did not present the same effectiveness as particles retained on the 8-mm sieve. Therefore, they should be considered with caution when estimating peNDF. The large size variation of the material retained on the 19 mm sieve (mainly husks) stimulated sorting in the feedbunk and part of those long particles were not ingested by the cows.

### ***Particle sorting index***

The PSI results are shown in Table 6. Cows receiving CS fractions showed slightly greater preference for particles <8 mm than cows fed the CON diet (% as fed, %

DM, % NDF, % uNDF). Among the CS fractions, animals receiving CS <8 mm had a greater preference for particles retained on the 8-mm sieve than animals receiving CS with 8-19 mm (% as fed). On the other hand, cows fed CS >19 mm showed a greater preference for particles <8 mm than CS with 8-19 mm (% as fed, % DM, % NDF, % uNDF). This finding suggests that the supply of particles retained on the 19-mm sieve, beyond of inducing refusal of long particles, stimulated preference for fine particles, ultimately increasing the difference between the offered and the actual consumed TMR. Ultimately, the CON showed greater selection in favor of NDF and uNDF than diets containing the fiber sources. Among CS fractions, higher starch refusal and lower NDF refusal was found for CS <8 mm compared to CS 8-19 mm. The CS >19 mm presented greater refusal for NDF, and uNDF and greater selection in favor of starch, than CS 8-19 mm, both conditions that induce the consumption of a diet different from formulated.

In all treatments, cows refused particles >19 mm (PSI < 100%) but refusal was less intense for the low fiber diet ( $P \leq 0.08$  for CN vs. CS fractions, except when expressed % as fed), and for the TMR containing CS with shorter particle size ( $P \leq 0.09$  for CS <8 mm vs. CS with 8-19 mm). This result demonstrates that CS particles retained on the 19-mm sieve are susceptible to contrary selection, but in diets with low NDF or with extremely processed fiber the selection is less intense (DeVries et al., 2008). Lactating cows can significantly change their TMR preference/selection for a diet with higher peNDF and slower starch fermentability, which may help alleviate but not eliminate SARA (Maulfair et al., 2013). Zebeli et al. (2009) also found greater selection against particles retained on the 19-mm sieve (mean PSI = 74%) for diets containing CS with different particle sizes. Offering diets that cause less selection can result in positive effects on energy intake throughout the day, as it reduces the variation in the nutritional value of the diet that remains in the feedbunk, especially in the hours after feed delivery (DeVries et al., 2005). Avoiding excess of very long particles in the diet is an alternative to reduce sorting and thus its negative impacts on animal health, efficiency and performance (Plaizier et al., 2009; McCarthy et al., 2018).

#### ***Particle size of swallowed bolus and rumen digesta***

Particle size of swallowed bolus and rumen digesta are shown in Table 7. The CON treatment had the highest proportion of particles with 1.18-8 mm in rumen digesta before morning feeding ( $P = 0.03$ ), and presented a tendency towards a lower proportion of particles with 8-19 mm compared with CS fractions ( $P = 0.08$ ). Among CS fractions,

lower proportion of 8-19 particles in the swallowed bolus was found for CS <8 mm when compared to CS with 8-19 mm ( $P = 0.05$ ). The CS had greater proportion of particles retained on the 19-mm sieve in the swallowed bolus and rumen digesta, lower proportion of particles between 1.18-8 mm in the rumen digesta, and a tendency of lower proportion of particles with 1.18-8 mm in the swallowed bolus than that of CS with 8-19 mm.

Differences of particle size in the swallowed bolus and rumen digesta reflect not only the distributions of offered TMR, but also particle comminution during mastication (Beauchemin, 2018) and sorting at the feedbunk. Differences of particle size are much smaller in bolus and digesta than in offered TMR. Schadt et al. (2012) found that, regardless of the offered particle size, cows chewed the feed particles until they reached approximately 10 to 11 mm in average size before swallowing. Santini et al. (1983) estimated that the point below which particle length affected total chewing time was approximately 10 mm. In a study evaluating combinations of uNDF and peNDF in the diet, Grant et al. (2018) found that for all diets the mean size of swallowed particles was 7 to 8 mm. In our study, the proportion of particles >19 mm in the treatment CS >19 mm decreased by 67% in the swallowed bolus compared to the TMR. Therefore, the supply of very long particles has a potential to influence the time of eating but a lower potential of altering rumination time, in addition to increasing the risk of sorting in the feedbunk. In fact, in our study CS >19 mm was no more physically effective than CS 8-19 mm.

### ***Characteristics of rumen digesta***

The rumen digesta of cows receiving the CON treatment showed a lower content of uNDF compared with cows fed CS fractions (Table 8). This result reflects the diet composition, as the CON had less uNDF, due to the lower proportion of forage in the diet. Additionally, ruminal mat of CON treatment was likely less consistent, as indicated by a greater distance traveled in 1 min than CS treatments (Welch, 1982).

The CON showed lower ruminal *in situ* disappearance (24 h) of CS (DM and NDF) compared with treatments containing CS fractions, which might have been a result of lower ruminal pH (Krajcarski-Hunt et al., 2002). The lower DM disappearance was mainly caused by the lower NDF disappearance of CS. Prolonged reductions in rumen pH below 6.0 are known to decrease the growth of cellulolytic bacteria and NDF digestibility (Russell and Wilson, 1996; Krajcarski-Hunt et al., 2002).

Solid particles of CS <8 mm had greater kp than CS with 8-19 mm (2.95 vs 2.26 %/h), as finely chopped fiber often has a shorter ruminal retention time than middle or

long particles. Rodrigue and Allen (1960) found that finely chopped hay had a faster passage rate and lower DM digestibility than middle or coarse chopped hay. Considering that most particles present in the rumen digesta are smaller than the diameter of the reticulo-omasal orifice, other factors other than the size of the orifice, such as the ruminal mat consistency, interfere with the size of particles leaving the rumen (Welch, 1982). Increased rate of passage of small particles has already been reported in conditions of lower consistency of the rumen mat (Allen and Grant, 2000).

Greater ruminal pool of DM >19 mm and a trend of greater pool of DM with 8-19 mm were found for CS >19 mm compared with the CS with 8-19 mm. A lower ruminal *in situ* disappearance (24 h) of FS DM was also observed for CS >19 mm. Greater ruminal pool was a reflect of greater proportion of long particles in the CS >19 mm, and perhaps because the lower DM disappearance of those particles, as CS >19 mm showed higher content of NDF, ADF, uNDF, and ADL. Although most of long particles was comminuted before swalled (see discussion above), the accumulation of particles >19 mm in the rumen digesta might have contributed to a greater filling and a physically-regulated lower DMI in the CS >19 mm treatment. No differences ( $P \geq 0.28$ ) were found between CON and CS fractions for rumen fluid pool and  $k_p$ , and valerate  $k_a$  and  $k_c$ .

### ***Ruminal fermentation pattern***

The CON treatment led to lower ruminal pH (mean, minimum, duration <5.8), acetate (%VFA), isobutyrate, (%VFA), caproate (%VFA) and acetate/propionate, and higher propionate (%VFA), total VFA (mM), and lactate (mM) than diets with CS fractions (Table 9). Animals fed CON experienced SARA as the daily mean rumen pH was <6.0 (Khorrami et al., 2021) and the duration of pH below 5.8 was greater than 5.2 h/d (Zebeli et al., 2008a). Lower ruminal pH was mainly caused by greater VFA concentration, but cows fed the CON had a slightly higher concentration of lactate in the rumen fluid.

The higher concentration of lactate in CON treatment may have been an outcome of amylolytic bacteria development (e.g., *Streptococcus bovis*), which is known to release lactic acid as a fermentation end product under great substrate availability and lower pH conditions (Hungate et al., 1952; Owens et al., 1998; Gill et al. al., 2000). However, in animals adapted to diets with concentrates, *S. bovis* development doesn't seem to be a concern (Nagaraja and Titgemeyer, 2007; Calsamiglia et al., 2012). On the other hand, lower pH conditions might have decreased the activity of lactate-consuming bacteria.

Fernando et al. (2010) observed a 5-fold reduction in the *Megasphaera elsdenii* population in animals during the adaptation to a high concentrate diet, due to the decrease in ruminal pH beyond the limits of survival of the microorganism. *M. elsdenii* and *Selenomonas ruminantium* are lactate-utilizing bacteria (Russell and Dombrowski, 1980; Goad et al., 1998). In our study, ruminal lactate concentration peaked 6 h after morning feeding (Figure 1), with values above 5 mmol/L. Nocek (1997) suggested that ruminal lactate  $\geq 5$  mmol/L is a threshold to predispose the ruminant to acute ruminal acidosis (ARA). The mean lactate concentration in the rumen fluid of CON animals was close to those reported by Khafipour et al. (2009a) (2.29 vs. 2.27 mM) for SARA-induced cows. In our cows receiving CS fractions, which not experienced SARA, lactate concentration was lower (mean = 1.65 mM) than that in CON and close to the value reported by Khafipour et al. (2009) for no SARA cows (mean = 1.33 mM).

Lower pH and greater VFA and lactate concentrations in the rumen fluid of cows fed CON were not only due to the lower NDF content but also because of the higher starch concentration in comparison with diets containing CS fractions. Although such higher starch concentration in CON is arguably confounded with lower NDF, replacing ground dry corn (admittedly with low physical effectiveness) with low-starch fibrous byproducts would affect the estimates of pef for CS fractions (Armentano and Pereira, 1997).

Regardless of particle size, CS fractions reduced the SARA condition, with mean pH  $>6$  (Khorrami et al., 2021) and duration of pH below 5.8 lesser than 5.2 h/d (Zebeli et al., 2008a). Among CS fractions, a trend of higher minimum pH was found for CS with 8-19 mm compared with CS  $<8$  mm. This result reflects the greater physical effectiveness of CS with 8-19 mm compared with CS  $<8$  mm, as it provided greater particle retention in the rumen and stimulates chewing, likely resulting in greater rumen motility and saliva production (Allen, 1997; Zebeli et al., 2012a; Humer, et al., 2018). Lower VFA concentration in the CS  $>19$  mm was likely a result of lower DMI.

### ***Total-tract digestibility and fecal traits***

Although the CS fractions did not affect total-tract digestibility and fecal traits, the CON induced lower digestibility of CP, ether extract, and starch ( $P \leq 0.04$ ) and a tendency of decreasing NDF, OM and DM digestibility ( $P \leq 0.09$ ; Table 10). The lower digestibility coefficients observed for CON might reflect the adverse conditions in the rumen digesta (i.e., low pH, less structured mat, and greater DM turnover rate). The



decrease in rumen pH often has a strong contribution to the reduction in fiber digestibility as well as feed efficiency in dairy cows (Allen and Mertens, 1988; Zebeli et al., 2010a). Rumen fibrolytic bacteria are sensitive to rumen pH below 6.0 (Shi and Weimer, 2002). A less consistent mat might also allow greater escape of starch and potentially digestible fiber from the rumen. Decreased apparent digestibility of starch indicates that post-ruminal digestion did not offset for lower ruminal degradation in the CON treatment. Ferraretto et al. (2013) found that each unit decrease in total-tract starch digestibility corresponded to a 3.4 percentage unit decrease in ruminal starch degradation. Moreover, in our study, the CON diet contained a greater proportion of starch from dry ground corn, which is less digestible than the ensiled starch (Ferraretto et al., 2013; Gomes et al., 2020).

The worst starch digestibility observed in CON resulted in higher fecal starch, which possibly explain the lower fecal score and fecal pH in the CON treatment. Upon greater passage of nutrients to the large intestine, greater fermentation occurs in this compartment resulting in increased acid production and osmotic pressure, which ultimately increases water inflow to the lumen and decreases fecal score (Huber, 1976; Plaizier et al., 2009). Greater fermentation in the cecum-colon must also have contributed to increase N losses in feces (Reynolds et al., 2001; Mertens e Grant, 2020), and decreased CP apparent digestibility. A lower EE digestibility observed for CON compared to CS fraction may be associated with a higher fecal starch excretion, since corn grain was the main source of starch and ether extract. Additionally, greater activity of microorganisms in the large intestine caused by the input of substrates can result in the formation of lipids in this compartment (Patton et al., 1968), thereby contributing to the lower EE digestibility.

### *Urinary purine derivatives*

Although calculating absolute changes in microbial protein synthesis based on the urinary purine derivatives has been discouraged, the purine derivative: creatinine ratio in spot urine samples can be used as an index of microbial protein supply for comparison of treatments (Hristov et al., 2019). In our study, CON showed a tendency towards lower  $(\text{Allantoin} / \text{Creatinine}) \times \text{BW}$ ,  $((\text{Allantoin} + \text{Uric acid}) / \text{Creatinine}) \times \text{BW}$ ,  $((\text{Allantoin} / \text{Creatinine}) \times \text{BW}) / \text{dOMI}$ , and  $((\text{Allantoin} + \text{Uric acid}) / \text{Creatinine}) \times \text{BW} / \text{dOMI}$ , when compared to CS fractions (Table 11). The CS <8 mm and CS with 8-19 mm induced similar purine derivative: creatinine ratios. However, in comparison with the CS with 8-19 mm, trend towards lower  $(\text{uric acid}/\text{creatinine}) \times \text{BW}$  was found for the CS >19 mm

treatment, which suggests a lower flow of microbial protein to the small intestine (Chen et al., 1995), and it is in line with the lower milk protein yield. Such reduction in microbial protein synthesis was possibly caused by a lower DMI in cows fed CS >19 mm.

### ***Blood metabolites***

Blood concentrations of glucose, urea, NEFA, and SAA were unaffected by the treatments. However, higher blood concentrations of D-lactate and LPS were found in cows fed the CON diet compared to FS. Carbohydrate fermentation in the rumen produces the two isomers (L and D) of lactic acid (Lorenz et al., 2003), but D-lactate may accumulate in the blood (Gentile et al., 2004). However, D-lactate concentrations obtained in the present study are extremely low and far from causing a lactic acidosis ( $\geq 3$  mmol/L of plasma; Uribarri et al., 1998).

The LPS are bioactive components of the cell wall of gram-negative bacteria (Nagaraja et al., 1978; Emmanuel et al., 2008; Khafipour et al., 2009c), and the concentration of endotoxins in the rumen fluid increases during the phase of accelerated growth and massive death of gram-negative bacteria due to the conditions induced by SARA (Hurley, 1995; Nagaraja et al., 1978). If the ruminal epithelium barrier is damaged, it may facilitate the translocation of toxins into the portal blood (Nocek, 1997; Plaizier et al., 2008). Khafipour et al. (2009a) found LPS concentrations 6 h after feeding of 0.31 EU/mL for SARA and <0.05 EU/mL for control cows. In our study, cows fed the CON diet had lower concentrations of LPS (0.179 EU/mL) than those reported by Khafipour et al. (2009a) for cows under SARA (0.31 EU/mL). Among CS fractions, higher concentration of plasma LPS was also found for CS <8 mm compared to CS with 8-19 mm (0.173 vs. 0.031 EU/mL;  $P < 0.01$ ), indicating that NDF of CS <8 mm, despite improving ruminal pH, still less physically effective than CS with 8-19 mm.

### ***Physical effectiveness factors (pef)***

Based on different animal responses, pef were calculated for CS fractions using the slope ratio approach (Armentano and Pereira, 1997). As expected, the pef varied with the selected response, but the NDF of CS <8 mm and CS >19 mm particles were less effective than that of CS with 8-19 mm. Mean values of pef were 0.45 for CS <8 mm and 0.79 for CS >19 mm, in comparison with CS with 8-19 mm (pef set to 1) (Table 12).

Recently, the NASEM (2021) adopted an approach to predict fiber requirement based on a model that consider greater effectiveness of long particles (>19 mm) than

middle particles (8-19 mm) (White et al., 2017a,b). Contrary, our findings suggest that NDF of CS >19 mm was less effective than NDF of CS with 8-19 mm, due to the comminution of particles before swallowing and sorting against long particles (>19 mm). Therefore, this fraction should be considered with caution when estimating peNDF for dairy cows.

Our results also demonstrate that NDF of CS <8 mm should not be neglected upon diet formulation. Previous studies have also reported some physical effectiveness for short-particle fibrous feedstuffs (Swain and Armentano, 1994; Clark and Armentano, 1997; Pereira et al., 1999), with a physical effectiveness of about one third of that from alfalfa NDF. The mean pef of 0.45 for CS <8 mm agrees with the observations of Depies and Armentano (1995), who stated that a reasonable interpretation would be to attribute part of the NDF effectiveness of the forage to its particle size. The other part of the effectiveness of the forage NDF, and most of the effectiveness of the NDF of non-forage fiber sources, is due to the effect of replacing non-fiber carbohydrates with NDF (Depies and Armentano, 1995).

## CONCLUSIONS

Different CS fractions stratified with the PSPS induced dissimilar effects on feed intake, digestion, blood metabolites, milk production and composition. The inclusion of CS fractions in a low fiber diet reduced signs of SARA condition, regardless of particle size. Ruminating, mat consistency and duration of ruminal pH <5.8 suggest some effectiveness of fNDF even when particles are smaller than 8 mm, but LPS and minimum pH imply that NDF of CS <8 mm is less effective than NDF of CS with 8-19 mm. On the other hand, NDF of CS >19 mm was less effective than CS 8-19 mm, due to the sorting behavior against particles >19 mm and, therefore, this fraction should be considered with caution when estimating peNDF for dairy cows.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the members of the GESF group, and to the employees of the Experimental Iguatemi Farm at the State University of Maringá for all their support in carrying out this work. We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq), Brasilia-DF, Brazil, for the scholarships provided to the authors.

## REFERENCES

- Allen, D. M., and R. J. Grant. 2000. Interactions between forage and wet corn gluten feed as sources of fiber in diets for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:322-331. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74882-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74882-X).
- Allen, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J. Dairy Sci.* 80:1447-1462. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76074-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76074-0).
- 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., B. J. Bradford, and M. Oba. 2009. Board-invited review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *J. Anim Sci.* 87:3317-3334. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1779>.
- Allen, M. S., D. R. Mertens. 1988. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. *J. Nutr.* 118:261-270. <https://doi.org/10.1093/jn/118.2.261>.
- AOAC International. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. AOAC International, Arlington, VA.
- AOAC International. 2000. *Official methods of analysis*. AOAC International. 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- AOAC. International. 2007. *Official methods of analysis*. AOAC International. 18th ed. AOAC Int., Gaithersburg, MD.
- ASAE. 2001. Method of determining and expressing particle size of chopped forage materials by sieving. S424 in *Standards*. Am. Soc. Agric. Eng., St. Joseph, MI.
- 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>.
- Balch, C. C., D. A. Balch, S. Bartlett, M. P. Bartrum, V. W. Johnson, S. J. Rowland and J. Turner. 1955. Studies on the secretion of milk of low fat content by cows on diets low in hay and high in concentrates. VI. The effects on the physical and biochemical processes of the reticulo-rumen. *J. Dairy Sci.* 22:270. <https://doi.org/10.1017/S0022029900007810>.
- Bailey, J. C., L. O. Tedeschi, E. D. M. Mendes, J. E. Sawyer, G.E. Carstens. 2012. Evaluation of bimodal distribution models to determine meal criterion in heifers fed a high-grain diet. *J. Animal Sc.* 90:2750-2753. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4634>.
- Beauchemin, K. A. 2018. Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:4762-4784. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13706>.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, and L. M. Rode. 2003. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation and milk production. *J. Dairy Sci.* 86:630–643. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73641-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73641-8).

- Binnerts, W. T., A. T. Van Tklooster, and A. M. Frens. 1968. Soluble chromium indicator measured by atomic absorption in digestion experiments. *Veterinary Record*. 82:470.
- Calsamiglia, S., M. Blanch, A. Ferret, and D. Moya. 2012. Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. *Anim. Feed Sci Technol*. 172:42-50. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.007>.
- Chaney, A. L., and E. P. Marback. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin Chem*. 8:130-137. <https://doi.org/10.1093/clinchem/8.2.130>.
- Chen, X. B., A. T. Mejia., D. J. Kyle, and E. R. Ørskov. 1995. Evaluation of the use of the purine derivative: creatinine ratio in spot urine and plasma samples as an index of microbial protein supply in ruminants: studies in sheep. *J. Agric Sci*. 125:137-143. <https://doi.org/10.1017/S002185960007458X>.
- Chen, X., and M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of the technical details. Occasional publication: International Feed Resources Unit, Rowett Research Institute.
- Clark, P. W., and L. E. Armentano. 1997. Influence of particle size on the effectiveness of beet pulp fiber. *J. Dairy Sci*. 80:898-904. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76012-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76012-0).
- Clark, P. W., and L. E. Armentano. 1999. Influence of particle size on the effectiveness of the fiber in corn silage. *J. Dairy Sci*. 82:581-588. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75270-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75270-7).
- Colman, E., W. B. Fokkink, M. Craninx, J. R. Newbold, B. De Baets, and V. Fievez. 2010. Effect of induction of subacute ruminal acidosis on milk fat profile and rumen parameters. *J. Dairy Sci*. 93:4759-4773. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3158>.
- Daniel, J. L. P., T. F. Bernardes, C. C. Jobim, P. Schmidt, and L. G. Nussio. 2019. Production and utilization of silages in tropical areas with focus on Brazil. *Grass Forage Sc*. 74:188-200. <https://doi.org/10.1111/gfs.12417>.
- Del Valle, T. A., T. F. Zenatti, G. Antonio, M. Campana, J. R. Gandra, E. M. C. Zilio, L.F.A. Mattos, and J. G. P. Morais. 2018. Effect of chitosan on the preservation quality of sugarcane silage. *Grass Forage Sci*. 73:630-638. <https://doi.org/10.1111/gfs.12356>.
- DeVries, T. J., F. Dohme, and K. A. Beauchemin. 2008. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feed sorting. *J. Dairy Sci*. 91:3958-3967. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1347>.
- DeVries, T. J., M. A. G. Keyserlingk, K. A. Beauchemin. 2005. Frequency of feed delivery affects the behaviour of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci*. 88:3553-3562. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73040-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73040-X).
- DeVries, T. J., M. A. G., Von Keyserlingk, D. M. Weary, K. A. Beauchemin. 2003. Measuring the feeding behavior of lactating dairy cows in early to peak lactation. *J. Dairy Sci*. 86:3354-3361. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73938-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73938-1)
- Dewanckele, L., P. G. Toral, B. Vlaeminck, and V. Fievez. 2020. Invited review: Role of rumen biohydrogenation intermediates and rumen microbes in diet-induced milk fat depression: An update. *J. Dairy Sci*. 103:7655-7681. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17662>.
- Fenton, T. W., M. Fenton. 1979. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. *Can. J. Anim. Sci*. 59:631-634. <https://doi.org/10.4141/cjas79-081>.
- Fernando, S. C., T. Purvis, H. F. Z. Najar, L. O. Sukharnikov, C. R. Krehbiel, T. G. Nagaraja, B. A. Roe, and U. Silva. 2010. Rumen microbial population dynamics

- during adaptation to a high-grain diet. *Appl Environ Microbiol.* 76:7482-7490. <https://doi.org/10.1128/AEM.00388-10>.
- Ferreira, G., and D. R. Mertens. 2005. Chemical and physical characteristics of corn silages and their effects on in vitro disappearance. *J. Dairy Sci.* 88:4414-4425. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73128-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73128-3).
- Gao, X., and M. Oba. 2014. Relationship of severity of subacute ruminal acidosis to rumen fermentation, chewing activities, sorting behavior, and milk production in lactating dairy cows fed a highgrain diet. *J. Dairy Sci.* 97:3006-3016. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7472>.
- Gentile, A., S. Sconza, I. Lorenz, G. Otranto, G. Rademacher, P. Famigli-Bergamini, and W. Klee. 2004. D-lactic acidosis in calves as a consequence of experimentally induced ruminal acidosis. *J. Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 51:64-70. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00600.x>
- Gill, H. S., Q. Shu, and R. A. Leng. 2000. Immunization with *Streptococcus bovis* protects against lactic acidosis in sheep. *Vaccine.* 18:2541-2548. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00017-7).
- 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.* 76:234-41. <https://doi.org/10.2527/1998.761234x>.
- Gomes, A. L., A. V. Bueno, F. A. Jacovaci, G. Donadel, L. F. Ferraretto, L. G. Nussio, and J. L. Daniel. 2020. Effects of processing, moisture, and storage length on the fermentation profile, particle size, and ruminal disappearance of reconstituted corn grain. *J. Anim Sci.* 98:1-9. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa332>.
- Gozho, G. N., D. O. Krause, and J. C. Plaizier. 2007. Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:856-866. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71569-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71569-2).
- Grant, R. J., W. A. Smith, M. D. Miller, K. Ishida, and A. Obata. 2018. Relationships between undigested and physically effective fiber in lactating dairy cows. Pages 35-47 in *Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manufac.* East Syracuse, NY. Cornell Univ., Ithaca, NY. <https://hdl.handle.net/1813/59839>.
- Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist, and K. V. V. Nurmela. 1998. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251-1261. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75686-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75686-3).
- Hristov, A.N., A. Bannink, L.A. Crompton, P. Huhtanen, M. Kreuzer, M. McGee, P. Nozière, C.K. Reynolds, A.R. Bayat, D.R. Yáñez-Ruiz, J. Dijkstra, E. Kebreab, A. Schwarm, K.J. Shingfield, and Z. Yu. 2019. Invited review: Nitrogen in ruminant nutrition: A review of measurement techniques. *J. Dairy Sci.* 102:5811-5852. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15829>.
- Huhtanen, P., K. Kaustell, and S. Jaakkola. 1994. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:211-227. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90173-2](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90173-2).
- Hungate, R. E., R. W. Dougherty, M. P. Bryant, and R. M. Cello. 1952. Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep. *Cornell Vet.* 42:423-449.
- Hurley, J. C. 1995. Endotoxemia: Methods of detection and clinical correlates. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:268-292. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.2.268>.

- Igathinathane, C., L. O. Pordesimo, E. P. Columbus, W. D. Batchelor, and S. Sokhansanj. 2009. Sieveless particle size distribution analysis of particulate materials through computer vision. *Comput Electron Agr.* 66:147-158. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2009.01.005>.
- Khafipour, E., S. Li, J. C. Plaizier, and D. O. Krause. 2009c. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Appl Environ Microbiol.* 75:7115–7124. <https://doi.org/10.1128/AEM.00739-09>.
- 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.* Vol. 104:7761-7780. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19890>.
- Krajcarski-Hunt, H., J. C. Plaizier, J. P. Walton, R. Spratt, and B. W. McBride. 2002. Short communication: Effect of subacute ruminal acidosis on in situ fiber digestion in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:570–573. 10.3168/jds.S0022-0302(02)74110-6.
- Kvidera, S. K., E. A. Horst, A. Abuajamieh, E. J. Mayorga, M. V. Sanz Fernandez, and L. H. Baumgard. 2017b. Glucose requirements of an activated immune system in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 100:2360–2374. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12001>.
- Lammers, B. P., D. R. Buckmaster, and A. J. Heinrichs. 1996. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 79:922–928. 10.3168/jds.S0022-0302(96)76442-1.
- Leonardi, C., L. E. Armentano. 2003. Effect of Quantity, Quality, and Length of Alfalfa Hay on Selective Consumption by Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 86:557–564. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73634-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73634-0).
- Litherland, N. Oklahoma Dairy Report – A dairy nutrition newsletter. Oklahoma State University Issue 2, vol. 1, 2007.
- Looper, M. L., S. R. Stokes, D. N. Waldner, and E. R. Jordan. 2001. Managing Milk Composition: Evaluating Herd Potential. Cooperative Extension Service College of Agriculture and Home Economics. Guide D-104.
- Lorenz, I., I. Hartmann, and A. Gentile. 2003. Determination of D-lactate in calf serum samples—an automated enzymatic assay. *Comp Clin Path.* 12:169-171. 10.1007/s00580-003-0499-6.
- Lu, Z., F. Stumpff, C. Deiner, J. Rosendahl, H. Braun, K. Abdoun, J. R. Aschenbach, and H. Martens. 2014. Modulation of sheep ruminal urea transport by ammonia and pH. *Am. J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 307:558–570. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00107.2014>.
- Maekawa, M., K. A. Beauchemin, and D. A. Christensen. 2002. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:1165-1175. 10.3168/jds.S0022-0302(02)74179-9.
- McCarthy, M. M., T. R. Overton, G. D. Mechor, D. E. Bauman, T. C. Jenkins, and D. V. Nydam. 2018. Field study to investigate the associations between herd-level risk factors for milk fat depression and bulk tank milk fat percent in dairy herds feeding monensin. *J. Dairy Sci.* 101:3118-3125. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13932>.
- McNeil, C. J., S. O. Hoskin, D. M. Bremner, G. Holtrop, and G. E. Lobley. 2016. Whole-body and splanchnic amino acid metabolism in sheep during an acute endotoxin challenge. *Br. J Nutr.* 116:211–222. <https://doi.org/10.1017/S0007114516001860>.
- 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).

- Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 85:1217–1240. <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.6.1217>.
- Mertens, D. R., and R. J. Grant. 2020. Digestibility and intake. *Forages: the science of grassland agriculture*, 2, 609-631.
- Nagaraja, T. G., and E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminant acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90:17-38. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-478>.
- Nagaraja, T. G., E. E. Bartley, L. R. Fina, H. D. Anthony, and R. M. Bechtle. 1978. Evidence of endotoxins in the rumen bacteria of cattle fed hay or grain. *J. Anim Sci.* 47:226–234. <https://doi.org/10.2527/jas1978.471226x>.
- National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (NASEM). 2021. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 8th ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Nocek, J. E. 1997. Bovine acidosis: Implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80:1005–1028. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76026-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76026-0).
- Nocek, J. E., and J. B. Russell. 1988. Protein and energy as an integrated system: Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* 71:2070–2107. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79782-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79782-9).
- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: A review. *J Anim Sci.* 76:275–286. <https://doi.org/10.2527/1998.761275x>.
- Patton, R. A., R. D. McCarthy, and L. C. Griel Jr. 1968. Lipid synthesis by rumen microorganisms. 1. Stimulation by methionine in vitro. *J. Dairy Sci.* 51:1310-1311. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(68\)87181-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(68)87181-4).
- Piperova, L. S., B. B. Teter, I. Bruckental, J. Sampugna, S. E. Mills, M. P. Yurawecz, and R. A. Erdman. 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat–depressing diet. *J. Nutr.* 130: 2568-2574. <https://doi.org/10.1093/jn/130.10.2568>.
- Plaizier, J. C., D. O. Krause, G. N. Gozho, and B. W. McBride. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* 176:21–31. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.016>.
- Pryce, J. D. 1969. A modification of Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. *Analyst.* 94:1151-1152. [10.1039/an9699401151](https://doi.org/10.1039/an9699401151).
- Reis, R. B., and D. K. Combs. 2000. Effects of increasing levels of grain supplementation on rumen environment and lactation performance of dairy cows grazing grass-legume pasture. *J. Dairy Sci.* 83:2888-2898. [10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75189-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75189-7).
- Resende Júnior J. C., M. N. Pereira, H. Boêr, 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)
- Reynolds, C. K., S. B. Cammell, D. J. Humphries, D. E. Beever, J. D. Sutton, and J. R. Newbold. 2001. Effects of postrumen starch infusion on milk production and energy metabolism in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:2250–2259. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74672-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74672-3).
- Rodrigue, C. B. and N. N. Allen. 1960. The effect of fine grinding of hay on ration digestibility, rate of passage and fat content of milk. *Can. J. Animal Sci.* 40:23-29. <https://doi.org/10.4141/cjas60-004>.



- Russell, J. B., and D. B. Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ Microbiol.* 39:604–610. <https://doi.org/10.1128/aem.39.3.604-610.1980>.
- Russell, J. B., and D. B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.* 79:1503–1509. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76510-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76510-4).
- Santini, F. J., A. R. Hardie, N. A. Jorgensen, and M. F. Finner. 1983. Proposed use of adjusted intake based on forage particle length for calculation of roughage indexes. *J. Dairy Sci.* 66:811-820. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81861-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81861-X).
- Savoie, P., M. A. Audy-Dube, G. Pilon, and R. Morissette. 2014. Length distribution and other dimensional parameters of chopped forage by image analysis. *Trans. ASABE* 57:1549–1555. <https://doi.org/10.13031/trans.57.10665>.
- Schadt, I., J. D. Ferguson, G. Azzaro, R. Petriglieri, M. Caccamo, P. Van Soest, and G. Licitra. 2012. How do dairy cows chew? Particle size analysis of selected feeds with different particle length distributions and of respective ingested bolus particles. *J. Dairy Sci.* 95:4707-4720. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5118>.
- Shi, Y., P.J. Weimer. 2002. Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. *Appl Environ Microbiol.* 58:2583–2591. <https://doi.org/10.1128/aem.58.8.2583-2591.1992>.
- Sudweeks, E. M., L. O. Ely and L. R. Sisk. 1980. Effect of intake on chewing activity of steers. *J. Dairy Sci.* 63:152-154. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)82900-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)82900-6).
- Swain, S. M., and L. E. Armentano. 1994. Quantitative evaluation of fiber from nonforage sources used to replace alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 77:2318-2331. [10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77175-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77175-7).
- Udén, P., P. E. Colucci, and P. J. Van Soest. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *J Sci Food Agric.* 31:625–632. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740310702>.
- Uribarri, J., M. S. Oh, and H. J. Carroll. 1998. D-lactic acidosis: a review of clinical presentation, biochemical features, and pathophysiologic mechanisms. *Medicine(Baltimore).* 77:73-82. [10.1097/00005792-199803000-00001](https://doi.org/10.1097/00005792-199803000-00001).
- Van Soest, P. J. 1973. Collaborative study of acid-detergent fiber and lignin. *J. Assoc Off Anal Chem.* 56:781-784. <https://doi.org/10.1093/jaoac/56.4.781>.
- Welch, J. G. 1982. Rumination, particle size and passage from the rumen. *J. Anim Sci.* 54:885-894. <https://doi.org/10.2527/jas1982.544885x>.
- White, R. R., M. B. Hall, J. L. Firkins, and P. J. Kononoff. 2017a. Physically adjusted neutral detergent fiber system for lactating dairy cow rations. I: Deriving equations that identify factors that influence effectiveness of fiber. *J. Dairy Sci.* 100:9551-9568. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12765>.
- White, R. R., M. B. Hall, J. L. Firkins, and P. J. Kononoff. 2017b. Physically adjusted neutral detergent fiber system for lactating dairy cow rations. II: Development of feeding recommendations. *J. Dairy Sci.* 100:9569-9584. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12766>.
- Zebeli, Q., B. N. Ametaj, B. Junck, and W. Drochner. 2009. Maize silage particle length modulates feeding patterns and milk composition in loose-housed lactating Holstein cows. *Livest Sci.* 124:33-40. [10.1016/j.livsci.2008.12.004](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.12.004).

- Zebeli, Q., D. Mansmann, B. N. Ametaj, H. Steingass, and W. Drochner. 2010a. A statistical model to optimize the requirements of lactating dairy cows for physically effective neutral detergent fibre. *Arch. Anim Nutr.* 64:265–278. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2010.486603>.
- Zebeli, Q., J. Dijkstra, M. Tafaj, H. Steingass, B.N. Ametaj, and W. Drochner. 2008a. Modeling dietary fiber adequacy in dairy cows based on responses of ruminal pH and milk fat production to diet composition. *J. Dairy Sci.* 91, 2046-2066. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0572>.
- Zebeli, Q., J. R. Aschenbach, M. Tafaj, J. Boguhn, B. N. Ametaj, and W. Drochner. 2012a. Invited review: Role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 95:1041-1056.
- Zebeli, Q., M. Tafaj, B. Junck, V. Ölschläger, B. N. Ametaj, and W. Drochner. 2008b. Evaluation of the response of ruminal fermentation and activities of nonstarch polysaccharide-degrading enzymes to particle length of corn silage in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:2388-2398. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0810>.
- Zebeli, Q., and E. Humer. 2017. An update of particle size and effective NDF in maize silage-based rations. Pages. 21-39. V International Symposium on Forage Quality and Conservation. FEALQ, Piracicaba, SP, Brazil. Accessed Jan. 2022. <http://www.isfqcbrazil.com.br/proceedings/2017/an-update-of-particle-size-and-effective-ndf-in-maize-silage-based-rations-159.pdf>>.

## TABLES

**Table 1.** Composition of diet ingredients (mean  $\pm$  SD; % DM, unless otherwise stated)

Item	CS <sup>1</sup>	CS <8 <sup>2</sup>	CS 8-19 <sup>3</sup>	CS >19 <sup>4</sup>	SH <sup>5</sup>	CG <sup>6</sup>	RCGS <sup>7</sup>	SM <sup>8</sup>
DM, % as fed	31.6 $\pm$ 1.55	34.9 $\pm$ 0.96	36.0 $\pm$ 1.07	32.2 $\pm$ 0.73	87.9 $\pm$ 0.39	88.1 $\pm$ 1.30	60.3 $\pm$ 1.29	88.4 $\pm$ 0.78
OM	96.0 $\pm$ 0.22	96.3 $\pm$ 0.22	96.6 $\pm$ 0.08	95.9 $\pm$ 0.09	95.1 $\pm$ 0.03	98.9 $\pm$ 0.04	98.8 $\pm$ 0.07	93.5 $\pm$ 0.01
Ether extract	3.00 $\pm$ 0.08	3.12 $\pm$ 0.20	2.23 $\pm$ 0.08	1.65 $\pm$ 0.13	2.59 $\pm$ 0.07	4.42 $\pm$ 0.01	4.40 $\pm$ 0.02	3.16 $\pm$ 0.05
CP	8.61 $\pm$ 0.56	8.69 $\pm$ 0.29	8.29 $\pm$ 0.21	8.73 $\pm$ 0.09	12.5 $\pm$ 0.02	8.96 $\pm$ 0.27	9.15 $\pm$ 0.10	49.2 $\pm$ 1.02
NFC	34.2 $\pm$ 3.54	46.1 $\pm$ 0.46	33.3 $\pm$ 1.66	17.5 $\pm$ 0.19	16.2 $\pm$ 0.76	73.4 $\pm$ 0.08	75.8 $\pm$ 0.35	29.5 $\pm$ 0.57
Starch	27.5 $\pm$ 0.92	41.9 $\pm$ 1.13	31.2 $\pm$ 0.92	15.1 $\pm$ 0.42	2.90 $\pm$ 0.11	69.3 $\pm$ 0.35	67.9 $\pm$ 0.39	7.10 $\pm$ 0.29
Non-starch NFC	6.67 $\pm$ 3.03	4.18 $\pm$ 0.81	2.14 $\pm$ 1.51	2.42 $\pm$ 0.28	13.3 $\pm$ 0.76	4.14 $\pm$ 0.08	7.94 $\pm$ 0.35	22.4 $\pm$ 0.57
NDF	50.2 $\pm$ 1.34	38.4 $\pm$ 0.61	52.8 $\pm$ 1.46	68.0 $\pm$ 0.34	63.8 $\pm$ 0.71	12.0 $\pm$ 0.15	9.36 $\pm$ 0.40	11.6 $\pm$ 0.48
ADF	29.1 $\pm$ 0.94	21.0 $\pm$ 0.44	29.6 $\pm$ 0.47	36.7 $\pm$ 0.69	46.1 $\pm$ 0.05	2.86 $\pm$ 0.03	2.78 $\pm$ 0.03	5.83 $\pm$ 0.23
ADF:NDF	0.58 $\pm$ 0.38	0.55 $\pm$ 0.04	0.56 $\pm$ 0.23	0.54 $\pm$ 0.12	0.72 $\pm$ 0.09	0.24 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.16	0.50 $\pm$ 0.01
ADL	4.43 $\pm$ 0.23	2.21 $\pm$ 0.28	3.38 $\pm$ 0.40	4.82 $\pm$ 0.72	2.31 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.26	1.42 $\pm$ 0.30
uNDF	14.3 $\pm$ 0.15	11.6 $\pm$ 0.34	14.4 $\pm$ 0.24	15.8 $\pm$ 0.36	4.52 $\pm$ 0.39	2.09 $\pm$ 0.17	2.19 $\pm$ 0.34	1.58 $\pm$ 0.02
uNDF, % NDF	28.5 $\pm$ 2.40	30.2 $\pm$ 0.54	27.3 $\pm$ 1.66	23.2 $\pm$ 0.58	7.08 $\pm$ 0.63	17.4 $\pm$ 1.69	23.4 $\pm$ 2.28	13.6 $\pm$ 0.21
CSPS <sup>11</sup>	65.9 $\pm$ 3.58	95.7 $\pm$ 1.87	48.7 $\pm$ 3.55	-	-	-	-	-
GMPS <sup>12</sup> , mm	-	-	-	-	-	0.98 $\pm$ 0.06	1.65 $\pm$ 0.21	-
GSD <sup>12</sup> , mm	-	-	-	-	-	0.67 $\pm$ 0.05	1.33 $\pm$ 0.11	-

<sup>1</sup>CS: whole-plant corn silage.

<sup>2</sup>CS <8: corn silage fraction <8 mm.

<sup>3</sup>CS 8-19: corn silage fraction with 8-19 mm.

<sup>4</sup>CS >19: corn silage fraction >19 mm.

<sup>5</sup>SH: soybean hulls.

<sup>6</sup>CG: corn grain, dry ground.

<sup>7</sup>RCGS: reconstituted corn grain silage, rolled, 145 d of storage.

<sup>8</sup>SM: soybean meal.

<sup>11</sup>CSPS: corn silage processing score (% starch passing through a 4.75-mm sieve; Ferreira and Mertens, 2005).

<sup>12</sup>Geometric mean particle size (GMPS) and geometric standard deviation (GSD) were calculated according to ASABE (2008; method S319.4) after measuring particle size distribution using a Ro-Tap Sieve Shaker.

**Table 2.** Composition (mean  $\pm$  SD) of the experimental diets

Item	Treatment <sup>1</sup>			
	CON	<8	8-19	>19
Diet ingredient, % DM				
CS <sup>2</sup>	33.7	33.7	33.7	33.7
Corn silage <8 mm	-	21.7	-	-
Corn silage 8-19 mm	-	-	15.5	-
Corn silage >19 mm	-	-	-	12.3
RCGS, rolled <sup>3</sup>	11.4	0.00	5.61	9.18
Corn grain, dry ground	18.5	8.46	8.46	8.46
Soybean hulls	15.0	15.0	15.0	15.0
Soybean meal	17.5	17.2	17.7	17.3
Sodium bicarbonate	1.00	1.00	1.00	1.00
Magnesium oxide	0.214	0.214	0.214	0.214
Minerals and vitamins mix <sup>4</sup>	2.74	2.74	2.74	2.74
Chemical composition, % DM				
DM <sup>5</sup> , % as fed	47.1 $\pm$ 1.86	45.6 $\pm$ 1.50	46.5 $\pm$ 1.83	47.5 $\pm$ 1.70
OM	92.5 $\pm$ 0.10	91.9 $\pm$ 0.13	92.1 $\pm$ 0.10	92.1 $\pm$ 0.10
Ether extract	3.27 $\pm$ 0.05	2.99 $\pm$ 0.09	2.93 $\pm$ 0.06	2.93 $\pm$ 0.07
CP	15.9 $\pm$ 0.44	15.9 $\pm$ 0.45	16.1 $\pm$ 0.43	16.0 $\pm$ 0.41
NFC	41.4 $\pm$ 0.42	35.1 $\pm$ 0.38	34.8 $\pm$ 0.37	34.4 $\pm$ 0.33
Starch	31.5 $\pm$ 0.49	25.9 $\pm$ 0.65	25.5 $\pm$ 0.57	24.9 $\pm$ 0.19
Ensiled starch <sup>6</sup>	17.0	18.4	17.9	17.4
Non-starch NFC	9.93 $\pm$ 0.46	9.21 $\pm$ 0.51	9.27 $\pm$ 0.40	9.47 $\pm$ 0.27
NDF	31.9 $\pm$ 0.71	37.9 $\pm$ 0.79	38.3 $\pm$ 0.90	38.8 $\pm$ 0.73
ADF	19.1 $\pm$ 0.37	23.0 $\pm$ 0.46	23.3 $\pm$ 0.44	23.3 $\pm$ 0.45
ADF:NDF	60.0 $\pm$ 0.50	60.1 $\pm$ 0.41	60.8 $\pm$ 0.62	60.0 $\pm$ 0.48
ADL	2.38 $\pm$ 0.16	2.65 $\pm$ 0.19	2.75 $\pm$ 0.21	2.85 $\pm$ 0.24
uNDF	6.43 $\pm$ 0.18	8.49 $\pm$ 0.20	8.33 $\pm$ 0.18	8.12 $\pm$ 0.20
uNDF, % NDF	20.2 $\pm$ 0.35	22.4 $\pm$ 0.16	21.7 $\pm$ 0.28	20.9 $\pm$ 0.21
Forage NDF <sup>7</sup> from basal CS	17.0	17.0	17.0	17.0
Forage NDF <sup>7</sup> from FS	-	8.33	8.18	8.30
Forage NDF (total)	17.0	25.3	25.2	25.3
Forage NDF: starch ratio	0.540	0.977	0.984	1.02
NDF>8 mm	12.5	12.2	20.3	20.5
NDF>19 mm	1.91	2.05	2.07	8.41

<sup>1</sup>CON: control; <8: fiber source retained on the pan; 8-19: fiber source retained on the 8-mm sieve and >19: fiber source retained on the 19-mm sieve.

<sup>2</sup>CS: whole-plant corn silage.

<sup>3</sup>RCGS: reconstituted corn grain silage stored for 145 d before feeding.

<sup>4</sup>Composition: 15.1% Ca, 6.95% P, 5.48% Mg, 1.83% S, 5,484 mg/kg Zn, 1,828 mg/kg Mn, 777 mg/kg Cu, 695 mg/kg F, 59 mg/kg I, 18 mg/kg Se, 73 mg/kg Co, 143,280 UI/kg vitamin A, 45,850 UI/kg vitamin D3, 2,006 UI/kg vitamin E.

<sup>5</sup>DM content of the CON treatment was adjusted by adding water.

<sup>6</sup>Starch from whole-plant CS, CS fractions (<8 mm, 8-19 mm or >19 mm), and RCGS.

approach [ruminal disappearance =  $kd / (kd + kp)$ ], assuming  $kp = 6.5\%/h$ ,  $kd = 28\%/h$  for ensiled starch, and  $kd = 7\%/h$  for dry starch from flint corn (Gomes et al., 2020).

<sup>7</sup>Forage NDF: estimated based on ingredients.

**Table 3.** Particle size distribution, and NDF distribution of the experimental diets (mean  $\pm$  SD)

Item	Treatment <sup>1</sup>			
	CON	<8	8-19	>19
PSPS <sup>2</sup> sieve, % as fed				
>19 mm	4.07 $\pm$ 2.81	3.65 $\pm$ 2.64	3.97 $\pm$ 2.23	15.7 $\pm$ 3.29
8 - 19 mm	26.5 $\pm$ 3.10	23.1 $\pm$ 2.86	43.3 $\pm$ 4.16	28.0 $\pm$ 2.25
<8 mm	69.4 $\pm$ 3.65	73.2 $\pm$ 2.89	52.8 $\pm$ 3.87	56.2 $\pm$ 4.66
Mean particle length <sup>3</sup>	4.47 $\pm$ 0.17	4.60 $\pm$ 0.40	5.99 $\pm$ 0.49	6.42 $\pm$ 0.24
GSD <sup>4</sup>	2.38 $\pm$ 0.12	2.26 $\pm$ 0.16	2.35 $\pm$ 0.10	2.89 $\pm$ 0.08
PSPS sieve DM, % DM				
>19 mm	3.32 $\pm$ 0.33	3.20 $\pm$ 0.84	3.23 $\pm$ 0.79	13.1 $\pm$ 2.71
8 - 19 mm	22.1 $\pm$ 5.69	20.2 $\pm$ 5.24	39.0 $\pm$ 4.87	23.9 $\pm$ 2.91
<8 mm	74.6 $\pm$ 3.54	76.6 $\pm$ 4.46	57.8 $\pm$ 4.64	63.0 $\pm$ 4.87
Mean particle length	3.89 $\pm$ 0.17	3.98 $\pm$ 0.28	5.27 $\pm$ 0.42	5.29 $\pm$ 0.36
GSD	2.33 $\pm$ 0.05	2.27 $\pm$ 0.10	2.40 $\pm$ 0.04	2.90 $\pm$ 0.12
PSPS sieve NDF, % diet DM				
>19 mm	1.91 $\pm$ 0.05	2.05 $\pm$ 0.01	2.07 $\pm$ 0.01	8.41 $\pm$ 0.15
8 - 19 mm	10.6 $\pm$ 0.36	10.2 $\pm$ 0.38	18.2 $\pm$ 1.39	12.1 $\pm$ 0.20
<8 mm	19.4 $\pm$ 0.77	25.7 $\pm$ 1.54	18.0 $\pm$ 1.17	18.3 $\pm$ 1.74
PSPS sieve uNDF, % diet DM				
>19 mm	0.42 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.02	0.41 $\pm$ 0.02	1.80 $\pm$ 0.05
8 - 19 mm	2.55 $\pm$ 0.18	2.58 $\pm$ 0.31	4.51 $\pm$ 0.17	2.90 $\pm$ 0.34
<8 mm	3.46 $\pm$ 0.33	5.46 $\pm$ 0.25	3.41 $\pm$ 0.31	3.42 $\pm$ 0.28
Ro-Tap <sup>5</sup> sieve, % DM				
>19 mm	3.03 $\pm$ 0.63	4.79 $\pm$ 3.14	3.95 $\pm$ 4.13	18.2 $\pm$ 5.24
8-19 mm	8.95 $\pm$ 0.15	7.38 $\pm$ 2.62	12.3 $\pm$ 4.49	9.15 $\pm$ 2.41
1.18-8 mm	55.4 $\pm$ 0.71	59.1 $\pm$ 1.69	57.6 $\pm$ 4.15	47.0 $\pm$ 3.06
<1.18 mm	32.7 $\pm$ 1.18	28.7 $\pm$ 2.14	26.1 $\pm$ 1.94	25.6 $\pm$ 1.79

<sup>1</sup>CON: control; <8: fiber source retained on the pan; 8-19: fiber source retained on the 8-mm sieve and >19: fiber source retained on the 19-mm sieve.

<sup>2</sup>Penn State particle separator, wet sieving.

<sup>3</sup>Calculated according to ASAE (2001)

<sup>4</sup>GSD: geometric standard deviation (ASAE, 2001).

<sup>5</sup>Dry sieving.

**Table 4.** Milk yield and composition

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM	P-Contrast		
	CON	<8	8-19	>19		CON vs. FS <sup>2</sup>	<8 vs. 8-19	8-19 vs. >19
Milk yield, kg/d	26.0	26.3	26.8	24.8	1.26	0.96	0.40	0.01
3.5% FCM, kg/d	24.7	26.0	27.2	25.2	1.22	0.02	0.06	0.01
ECM, kg/d	24.7	25.8	26.9	24.8	1.17	0.06	0.07	0.01
Milk fat, %	3.18	3.43	3.62	3.46	0.082	<0.01	0.06	0.11
Milk fat, kg/d	0.827	0.901	0.962	0.889	0.0418	<0.01	0.02	0.01
Protein, %	3.37	3.27	3.28	3.30	0.072	0.09	0.90	0.66
Protein, kg/d	0.865	0.857	0.873	0.798	0.0338	0.20	0.37	0.01
Lactose, %	4.75	4.77	4.84	4.81	0.046	0.26	0.20	0.57
Solids, %	12.3	12.5	12.6	12.6	0.09	0.03	0.15	0.71
MUN, mg/dL	10.3	11.2	11.5	12.1	1.08	0.02	0.55	0.41
Log <sub>10</sub> SCC	2.04	2.20	2.16	2.22	0.245	0.35	0.79	0.68
ECM/DMI	1.19	1.21	1.23	1.19	0.047	0.39	0.37	0.15
ECM/OMI	1.29	1.31	1.33	1.29	0.050	0.47	0.37	0.12
ECM/dOMI <sup>3</sup>	1.99	2.10	2.12	2.04	0.110	0.15	0.83	0.38
BW, kg	597	600	605	600	37.0	0.35	0.32	0.32
BCS	3.24	3.24	3.29	3.27	0.089	0.49	0.32	0.69

<sup>1</sup>CON: control; <8: fiber source retained on the pan; 8-19: fiber source retained on the 8-mm sieve; and >19: fiber source retained on the 19-mm sieve.

<sup>2</sup>FS: fiber sources (CS <8, 8-19 and >19).

<sup>3</sup>dOMI: intake of digestible OM.

**Table 5.** Nutrient intake and feeding behavior

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM	P-Contrast		
	CON	<8	8-19	>19		CON vs. FS <sup>2</sup>	<8 vs. 8-19	8-19 vs. >19
<i>Intake</i>								
DM, kg/d	20.8	21.6	22.4	21.2	0.45	0.03	0.08	0.03
NDF, kg/d	6.55	8.09	8.37	7.94	0.156	<0.01	0.09	0.03
NDF>8 mm, kg/d	2.60	2.64	4.54	4.36	0.086	<0.01	<0.01	0.09
NDF>19 mm, kg/d	0.40	0.44	0.46	1.79	0.033	<0.01	0.61	<0.01
uNDF, kg/d	1.33	1.83	1.86	1.69	0.036	<0.01	0.38	<0.01
Starch, kg/d	6.58	5.53	5.71	5.27	0.115	<0.01	0.13	<0.01
dOM <sup>3</sup> , kg/d	12.4	12.4	12.8	12.1	0.36	0.88	0.36	0.19
<i>Chewing behavior</i>								
Eating, min/d	221	235	256	232	17.1	0.09	0.13	0.08
Eating, min/kg DM	11.4	12.6	13.4	12.9	0.73	0.02	0.29	0.55
Eating, min/kg NDF	36.4	33.6	35.8	35.2	1.87	0.38	0.29	0.78
Eating, min/kg NDF >8 mm	91.3	103	65.9	63.0	4.68	<0.01	<0.01	0.56
Eating, min/kg NDF >19 mm	597	616	644	154	32.8	<0.01	0.49	<0.01
Eating, min/kg uNDF	179	149	161	161	9.1	0.02	0.27	0.95
Ruminating, min/d	383	424	462	425	18.2	0.01	0.07	0.09
Ruminating, min/kg DM	19.8	23.0	24.5	23.9	1.19	<0.01	0.08	0.46
Ruminating, min/kg NDF	63.3	61.3	65.8	65.2	3.45	0.72	0.08	0.82
Ruminating, min/kg NDF >8 mm	159	188	121	117	8.7	0.02	<0.01	0.54
Ruminating, min/kg NDF >19 mm	1037	1125	1183	285	51.4	<0.01	0.26	<0.01
Ruminating, min/kg uNDF	312	272	295	299	16.2	0.05	0.07	0.76
Chewing, min/d	603	659	718	657	21.9	<0.01	0.01	0.01
Chewing, min/kg DM	31.2	35.6	37.9	36.9	1.23	<0.01	0.02	0.24
Chewing, min/kg NDF	99.7	94.9	102	100	3.50	0.68	<0.01	0.57
Chewing, min/kg NDF >8 mm	250	291	187	180	9.0	<0.01	<0.01	0.31
Chewing, min/kg NDF >19 mm	1634	1741	1828	439	52.0	<0.01	0.09	<0.01
Chewing, min/kg uNDF	491	422	456	460	15.8	<0.01	<0.01	0.67
<i>Meal behavior</i>								
Meal frequency, meals/d	8.56	10.2	9.81	9.06	0.385	0.01	0.34	0.07
First meal duration, min	39.7	37.8	43.1	39.7	2.97	0.88	0.22	0.42
Meal duration, min/meal	31.2	28.0	29.9	29.3	2.23	0.11	0.22	0.68
Meal time, min	258	279	295	268	17.1	0.10	0.28	0.10
Meal interval, min	146	119	124	137	4.8	<0.01	0.40	0.04
Meal size, kg DM/meal	2.32	1.84	1.95	1.95	0.104	<0.01	0.28	0.98
Meal size, kg NDF/meal	0.727	0.691	0.729	0.717	0.0389	0.63	0.27	0.72
Meal size, kg uNDF/meal	0.147	0.156	0.163	0.157	0.0087	0.13	0.37	0.43
Meal size, kg starch/meal	0.735	0.472	0.499	0.488	0.0280	<0.01	0.42	0.73

<sup>1</sup>CON: control; <8: fiber source retained on the pan; 8-19: fiber source retained on the 8-mm sieve; and >19: fiber source retained on the 19-mm sieve.

<sup>2</sup>FS: fiber sources (CS <8, 8-19 and >19).

<sup>3</sup>dOM: digestible OM.

**Table 6.** Particle sorting index (PSI)

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM	P-Contrast		
	CON	<8	8-19	>19		CON vs. FS <sup>2</sup>	<8 vs. 8-19	8-19 vs. >19
PSI, % as fed								
>19 mm	89.8	90.0	83.1	80.3	3.86	0.11	0.09	0.48
8-19 mm	101	101	99.0	99.0	0.62	0.21	0.01	0.99
<8 mm	100	100	102	104	0.5	<0.01	<0.01	<0.01
PSI, % DM								
>19 mm	89.9	90.7	80.6	78.2	3.67	0.04	0.01	0.52
8-19 mm	101	102	99.0	98.9	0.91	0.53	0.03	0.92
<8 mm	101	101	102	105	0.7	<0.01	0.06	<0.01
PSI, % NDF <sup>3</sup>								
>19 mm	89.2	91.4	80.0	78.7	3.70	0.08	<0.01	0.72
8-19 mm	101	102	98.0	99.1	0.93	0.38	<0.01	0.44
<8 mm	100	102	102	104	0.6	<0.01	0.67	<0.01
PSI, % uNDF								
>19 mm	90.0	91.1	79.1	78.8	3.70	0.03	<0.01	0.92
8-19 mm	101	102	98.6	98.9	0.93	0.38	0.01	0.79
<8 mm	99.7	102	102	104	0.62	<0.01	0.82	<0.01
Diet NDF sorting, %	98.9	99.0	97.8	95.6	0.42	<0.01	0.02	<0.01
Diet uNDF sorting, %	99.5	98.3	98.2	96.0	0.60	<0.01	0.87	<0.01
Diet starch sorting, %	100	99.1	100	102	0.40	0.85	<0.01	<0.01

<sup>1</sup>CON: control; <8: fiber source retained on the pan; 8-19: fiber source retained on the 8-mm sieve; and >19: fiber source retained on the 19-mm sieve.

<sup>2</sup>FS: fiber sources (CS <8, 8-19 and >19).

<sup>3</sup>The actual levels of NDF and uNDF retained on each sieve were used.



**Table 7.** Dry sieving of swallowed bolus and rumen digesta evacuated 1-h before morning feeding and 8-h after morning feeding

Ro-Tap sieve <sup>3</sup> , mm	Treatment <sup>1</sup>				SEM	P-Contrast		
	CON	<8	8-19	>19		CON vs. FS <sup>2</sup>	<8 vs. 8-19	8-19 vs. >19
Swallowed bolus								
>19 mm	2.40	2.40	2.57	6.04	0.707	0.15	0.86	0.01
8-19 mm	4.54	4.72	8.40	8.57	1.083	0.08	0.05	0.92
1.18-8 mm	59.9	64.5	63.8	59.0	1.49	0.18	0.76	0.06
<1.18 mm	33.2	28.4	25.2	26.4	1.88	0.02	0.27	0.68
Rumen digesta 1-h before morning feeding								
>19 mm	1.54	0.855	0.880	2.25	0.421	0.47	0.94	<0.01
8-19 mm	4.37	3.70	4.31	5.54	0.422	0.78	0.35	0.09
1.18-8 mm	63.8	61.6	63.5	58.7	1.18	0.03	0.15	<0.01
<1.18 mm	30.3	33.8	31.3	33.5	1.20	0.11	0.19	0.24
Rumen digesta 8-h after morning feeding								
>19 mm	2.87	2.62	2.09	4.01	0.688	0.95	0.50	0.04
8-19 mm	5.46	5.19	5.78	7.19	0.738	0.49	0.58	0.20
1.18-8 mm	62.5	64.4	63.6	57.2	0.95	0.45	0.49	<0.01
<1.18 mm	29.2	27.8	28.5	31.6	1.43	0.94	0.70	0.16

<sup>1</sup>CON: control; <8: fiber source retained on the pan; 8-19: fiber source retained on the 8-mm sieve; and >19: fiber source retained on the 19-mm sieve.

<sup>2</sup>FS: fiber sources (CS <8, 8-19 and >19).

<sup>3</sup>Particle size distribution measured in dried samples using a Ro-tap Sieve Shaker.

**Table 8.** Characteristics of rumen digesta

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM	P-Contrast		
	CON	<8	8-19	>19		CON vs. FS <sup>2</sup>	<8 vs. 8-19	8-19 vs. >19
Rumen content								
DM, % wet weight	12.6	11.9	12.3	12.2	0.49	0.41	0.55	0.83
OM, % DM	91.2	89.9	90.9	90.3	0.44	0.18	0.13	0.37
NDF, % DM	61.2	62.8	63.5	62.4	1.63	0.27	0.62	0.46
uNDF, % DM	27.7	31.1	29.8	30.3	1.09	0.03	0.20	0.54
uNDF:NDF	46.9	49.7	47.0	48.1	1.82	0.23	0.08	0.44
Rumen pool, kg								
Wet weight	72.8	72.8	74.5	74.8	6.33	0.71	0.60	0.93
DM	9.36	8.78	9.30	9.13	0.998	0.63	0.41	0.78
OM	8.52	7.88	8.47	8.24	0.904	0.58	0.33	0.70
NDF	5.69	5.56	5.86	5.60	0.740	0.96	0.51	0.57
uNDF	2.48	2.52	2.68	2.65	0.327	0.38	0.40	0.85
Dry sieving								
DM >19 mm	0.227	0.170	0.165	0.318	0.0638	0.84	0.92	0.02
DM 8-19 mm	0.502	0.398	0.488	0.603	0.0853	0.92	0.14	0.08
DM 1.18-8 mm	5.93	5.56	5.92	5.26	0.610	0.36	0.35	0.12
DM <1.18 mm	2.66	2.65	2.72	2.94	0.282	0.66	0.79	0.40
Ruminal mat								
Distance traveled, cm	62.5	60.5	60.3	61.3	1.01	0.09	0.83	0.40
Ascension time, min	27.5	30.5	34.5	28.0	6.06	0.60	0.63	0.44
Ascension rate, cm/min	2.65	2.35	2.01	2.51	0.546	0.62	0.65	0.51
Distance traveled in min 1, cm	16.0	9.50	6.50	8.00	1.635	<0.01	0.27	0.53
DM fractional turnover rate, %/h	9.13	8.63	8.48	7.82	0.544	0.29	0.84	0.41
Fractional passage rate, %/h								
FS <sup>2</sup>	-	2.95	2.26	2.05	0.415	-	0.03	0.34
Diet uNDF	2.15	2.29	2.34	2.10	0.179	0.63	0.79	0.23
Ruminal <i>in situ</i> disappearance (24 h), %								
FS DM	-	65.2	63.7	51.0	0.82	-	0.11	<0.01
FS NDF	-	30.9	29.8	38.0	1.81	-	0.75	0.20
CS <sup>3</sup> DM	55.9	63.0	63.5	64.0	1.96	0.02	0.80	0.83
CS NDF	33.3	41.2	42.5	43.0	3.16	0.03	0.75	0.91
Rumen fluid								
Pool, L	62.5	63.2	64.2	64.7	5.33	0.58	0.71	0.87
kp <sup>4</sup> , %/h	10.8	11.8	9.80	8.79	0.629	0.36	0.07	0.30
Valerate								
kc <sup>5</sup> , %/h	36.5	38.9	38.0	35.8	1.88	0.58	0.70	0.36
ka <sup>6</sup> , %/h	25.7	27.2	28.2	27.0	1.94	0.30	0.61	0.56

<sup>1</sup>CON: control; <8: fiber source retained on the pan; 8-19: fiber source retained on the 8-mm sieve; and >19: fiber source retained on the 19-mm sieve.

<sup>2</sup>FS: fiber sources (CS <8, 8-19 and >19).

<sup>3</sup>CS: whole-plant corn silage.

<sup>4</sup>kp: fractional passage rate.

<sup>5</sup>kc: fractional clearance rate.

<sup>6</sup>ka: fractional absorption rate.

**Table 9.** Ruminal fermentation pattern

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM	P-Contrast <sup>2</sup>		
	CON	<8	8-19	>19		CON vs. FS <sup>3</sup>	<8 vs. 8-19	8-19 vs. >19
Mean pH	5.85	6.07	6.12	6.12	0.066	<0.01	0.24	0.90
Minimum pH	5.50	5.67	5.83	5.74	0.080	0.02	0.07	0.29
Duration pH <5.8, h/d	11.1	3.36	2.50	3.02	1.563	<0.01	0.40	0.60
Ammonia, mg/dL	15.4	15.1	13.8	13.9	1.16	0.31	0.28	0.97
Lactate, mM	2.27	1.37	1.32	1.31	0.162	<0.01	0.84	0.97
Total VFA, mM	109	101	104	91.7	4.1	<0.01	0.26	<0.01
Acetate, % VFA	54.7	56.7	59.3	58.1	1.39	0.02	0.07	0.40
Propionate, % VFA	25.6	21.8	20.2	21.1	1.92	0.03	0.43	0.67
Isobutyrate, % VFA	0.942	1.10	1.03	1.23	0.068	0.04	0.46	0.03
Butyrate, % VFA	14.2	15.2	14.5	14.5	0.98	0.68	0.60	0.98
Isovalerate, % VFA	2.02	2.57	2.52	2.54	0.174	<0.01	0.75	0.87
Valerate, % VFA	1.64	1.57	1.42	1.51	0.136	0.31	0.26	0.49
Caproate, % VFA	0.885	1.02	1.04	1.08	0.099	<0.01	0.63	0.33
Acetate/Propionate	2.29	2.69	2.95	2.77	0.210	0.02	0.23	0.41

<sup>1</sup>CON: control; <8: fiber source retained on the pan; 8-19: fiber source retained on the 8-mm sieve; and >19: fiber source retained on the 19-mm sieve.

<sup>2</sup>There was interaction between treatment and time only for lactate (P=0.01; Figure 1).

<sup>3</sup>FS: fiber sources (CS <8, 8-19 and >19).

**Table 10.** Total-tract digestibility and fecal traits

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM	P-Contrast		
	CON	<8	8-19	>19		CON vs. FS <sup>2</sup>	<8 vs. 8-19	8-19 vs. >19
Apparent digestibility, %								
DM	66.1	68.7	68.4	68.6	1.22	0.09	0.85	0.93
OM	67.2	69.9	69.6	69.7	1.27	0.08	0.84	0.95
NDF	45.5	49.6	50.0	49.4	2.50	0.07	0.86	0.80
CP	66.4	69.6	69.5	69.2	1.11	0.04	0.97	0.84
Ether extract	83.9	89.1	89.9	90.8	1.09	<0.01	0.62	0.55
Starch	90.7	94.1	94.0	93.9	0.53	<0.01	0.84	0.98
Fecal traits								
Fecal pH	6.79	7.32	7.18	7.19	0.062	<0.01	0.13	0.93
Fecal score (1-5)	2.88	3.03	3.01	3.02	0.070	<0.01	0.66	0.83
Fecal starch, % DM	8.54	4.86	4.90	4.78	0.320	<0.01	0.91	0.72

<sup>1</sup>CON: control; <8: fiber source retained on the pan; 8-19: fiber source retained on the 8-mm sieve; and >19: fiber source retained on the 19-mm sieve.

<sup>2</sup>FS: fiber sources (CS <8, 8-19 and >19).

**Table 11.** Urinary purine derivatives and blood metabolites

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM	P-Contrast		
	CON	<8	8-19	>19		CON vs. FS <sup>2</sup>	<8 vs. 8-19	8-19 vs. >19
Urinary purine derivatives								
(Allantoin/Creatinine)×BW	846	1168	1032	965	90.8	0.07	0.28	0.58
(Uric acid/Creatinine)×BW	152	165	171	132	14.3	0.82	0.78	0.07
((Allantoin+Uric acid)/Creatinine)×BW	997	1332	1203	1098	97.9	0.09	0.34	0.44
((Allantoin/Creatinine)×BW)/dOMI <sup>3</sup>	69.3	94.8	82.5	80.0	8.25	0.06	0.19	0.78
((Uric acid/Creatinine)×BW)/dOMI	12.4	13.1	13.0	10.8	1.32	0.96	0.94	0.21
((Allantoin+Uric acid)/Creatinine)×BW)/dOMI	81.7	108	95.5	90.8	9.12	0.08	0.22	0.64
Blood metabolites								
Plasma glucose, mg/dL	59.5	60.0	60.9	58.6	1.87	0.87	0.68	0.29
Plasma urea, mg/dL	23.4	25.3	23.7	24.8	1.58	0.33	0.30	0.44
Serum NEFA, mmol/L	0.284	0.273	0.273	0.281	0.0070	0.28	0.99	0.42
Plasma LPS, EU/mL	0.179	0.173	0.031	0.034	0.0088	<0.01	<0.01	0.79
Plasma SAA, ug/mL	57.6	35.5	39.7	35.8	17.74	0.21	0.84	0.85
Serum D-Lactate, mmol/L	0.544	0.427	0.451	0.459	0.04	0.03	0.50	0.86

<sup>1</sup>CON: control; <8: fiber source retained on the pan; 8-19: fiber source retained on the 8-mm sieve; and >19: fiber source retained on the 19-mm sieve.

<sup>2</sup>FS: fiber sources (CS <8, 8-19 and >19).

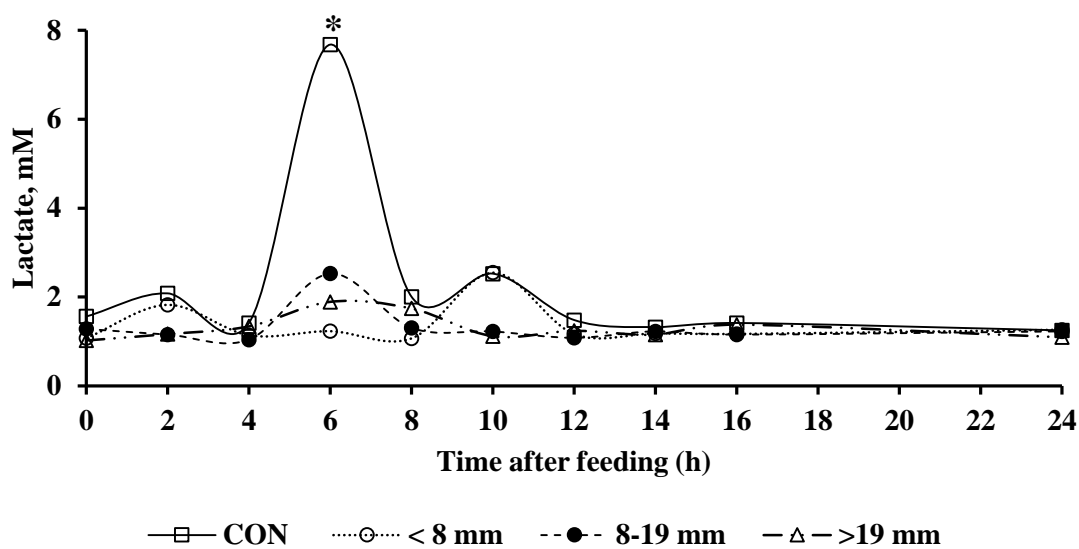
<sup>3</sup>dOMI: intake of digestible OM.

**Table 12.** Physical effectiveness factors (pef) based on animal responses for NDF stratified with the Penn State particle separator

Item	Fiber sources		
	<8 mm	8-19 mm <sup>1</sup>	>19 mm
pef (Rumination, min/kg DM)	0.66	1.00	0.85
pef (1/Distance traveled in min 1, cm)	0.46	1.00	0.67
pef (1/Duration of ruminal pH <5.8, h/d)	0.65	1.00	0.76
1/Plasma LPS, EU/mL	0.01	1.00	0.87

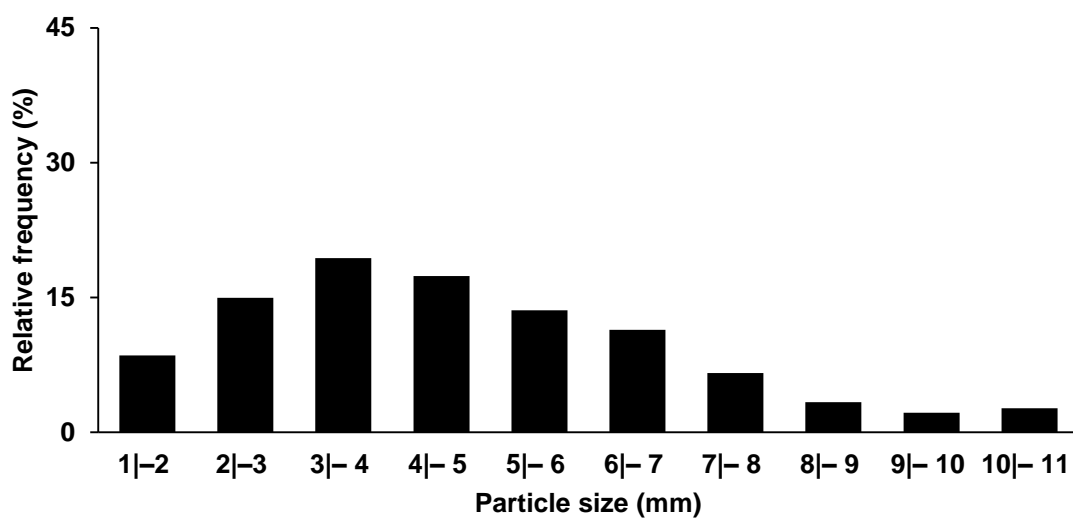
<sup>1</sup>pef of NDF retained on the 8-mm screen was set to 1.

FIGURE



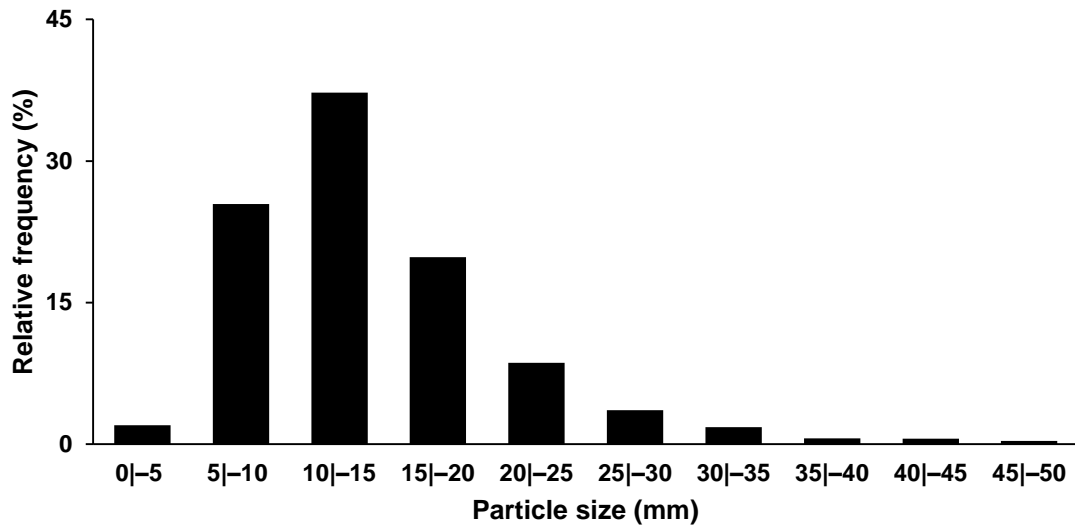
**Figure 1.** Lactate concentration in rumen fluid. SEM = 0.51.  $P < 0.01$  for interaction between treatment and time. CON: control; CS <8: fiber source retained on the pan; CS 8 - 19: fiber source retained on the 8-mm sieve; and >19: fiber source retained on the 19-mm sieve. \* $P < 0.01$  for CON vs. Fiber sources.

## SUPPLEMENTAL FIGURES

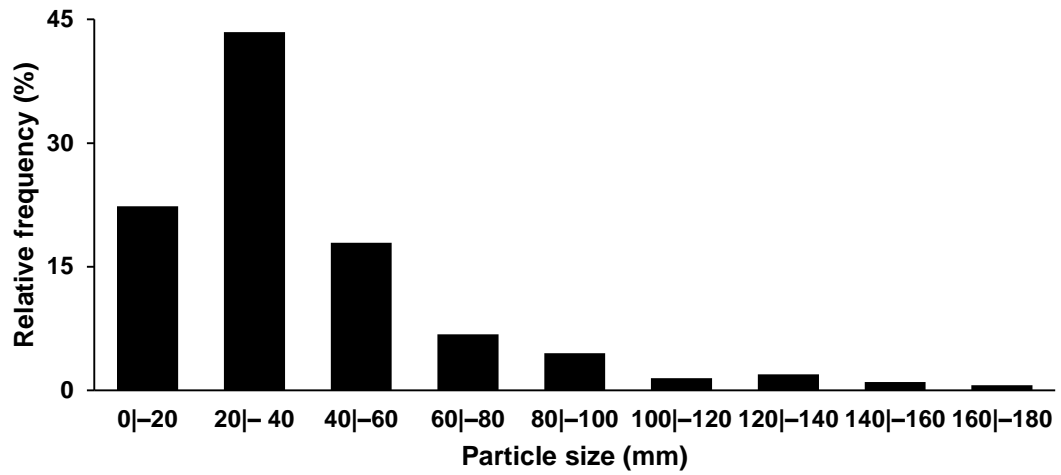


**Supplemental figure S1.** Relative frequency of particles retained on the pan. Mean = 4.67 mm; mode = 4.50 mm; minimum = 1.00 mm; maximum = 11.0 mm; median = 4.40 mm; SD = 2.15 mm; kurtosis = 0.014 mm, and skewness using the mode = 0.077 mm or the median = 0.371 mm.





**Supplemental figure S2.** Relative frequency of particles retained on the 8-mm sieve. Mean = 13.2 mm; mode = 10.0 mm; minimum = 1.00 mm; maximum = 48 mm; median = 11.5 mm; SD = 6.91 mm; kurtosis = 3.93 mm, and skewness using the mode = 0.460 mm or the median = 0.727 mm.



**Supplemental figure S3.** Relative frequency of particles retained on the 19-mm sieve. Mean = 37.9 mm; mode = 30.0 mm; minimum = 1.00 mm; maximum = 175 mm; median = 30.0 mm; SD = 30.8 mm; kurtosis = 3.99 mm, and skewness using the mode = 0.257 mm or the median = 0.770 mm.

## V. INTERPRETAÇÃO E RECOMENDAÇÕES

No capítulo anterior, foi possível constatar que as frações da silagem de milho (SM) estratificadas com o separador de partículas da Penn State (PSPS) induziram respostas diferentes em consumo de matéria seca (CMS), digestão, metabolismo, produção e composição do leite. Os fatores de efetividade física da FDN, calculados com base em respostas dos animais foram 0,45 para partículas <8 mm e 0,79 para partículas >19 mm, comparativamente às partículas retidas na peneira de 8 mm (assumido = 1) (médias obtidas a partir da Tabela 12). Frente aos resultados, surge a seguinte pergunta:

**“Como o tamanho teórico de corte (TTC) definido no momento da colheita afeta a efetividade física da silagem de milho?”**

Para responder esta pergunta, integramos os resultados obtidos no presente estudo com dados da literatura. Para sumarizar estudos que descreveram o TTC e o tamanho de partículas da silagem de milho, realizamos revisão bibliográfica utilizando Google Scholar, PubMed, ScienceDirect, Scirus, Scopus, Web of Science e referências listadas em publicações científicas, para sumarizar estudos que descreveram o TTC e o tamanho de partículas da silagem de milho. Sabendo que o tamanho de partículas da silagem de milho é fruto da interação de fatores relacionados à planta (i.e., híbrido, ponto de corte), à máquina utilizada na colheita (i.e., marca, modelo, processador e desgaste dos componentes) e à regulagem do equipamento (i.e., TTC), foram selecionados trabalhos nos quais: 1) a colheita foi realizada com colhedora de forragem autopropelida, 2) houve comparação de pelo menos dois TTC sem a repicagem do material em outro equipamento, e 3) a estratificação de partículas no PSPS foi descrita. Inicialmente foram encontradas 51 publicações, mas somente 11 trabalhos (total de 35 médias de tratamentos) foram mantidos no banco de dados final (Tabela 1). Os demais trabalhos foram excluídos pois não atenderam pelo menos um dos requisitos listados anteriormente.

O TTC variou de 4,8 mm a 39,7 mm, representando um intervalo de TTC abrangente. As retenções nas peneiras (% da MS ou MN) foram de 1,50 a 72,2 para a peneira de 19 mm, de 15,8 a 79,0 para a peneira de 8 mm e 10,1 a 71,1 para o fundo.

Na sequência os dados foram modelados com regressão segmentada utilizando o procedimento NLMIXED do SAS (Robbins et al., 2006, [http://dx.doi.org/10.2527/2006.8413\\_supple155x](http://dx.doi.org/10.2527/2006.8413_supple155x)). O modelo utilizado foi o seguinte: Se  $TTC \leq B$ , então  $Y = I + S1 \times TTC$ ; se  $TTC > B$  então  $Y = (I + S1 \times TTC) + S2 \times (TTC - B)$ ; onde: B = valor de TTC para o ponto de quebra, Y = variável resposta, I = intercepto, S1 = inclinação do primeiro seguimento, S2 = inclinação do segundo seguimento. O modelo também incluiu o efeito aleatório de experimento (Tabela 2). As variáveis resposta ao TTC foram: % partículas >19 mm, % partículas retidas na peneira de 8 mm, % partículas <8 mm, fator de efetividade física (%) calculado pela soma das retenções nas peneiras de 8 e 19 mm ( $f_{ef>8mm}$ ; Zebeli et al., 2012, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4421>) e fator de efetividade física (%) ponderado para a efetividade de cada peneira apresentadas no início desse tópico ( $f_{efbio}$ ), calculado como:  $[(\% \text{ retida na peneira de } 19 \text{ mm} \times 0,79) + (\% \text{ retida na peneira de } 8 \text{ mm} \times 1,00) + (\% \text{ retida no fundo} \times 0,45)]$ .

**Tabela 1.** Estudos sumarizados nesta revisão sobre a distribuição de partículas da silagem de milho colhida com diferentes tamanhos teóricos de corte

DOI ou endereço eletrônico	Referência	Tamanho teórico de corte (mm)
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73601-7">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73601-7</a>	Johnson et al., 2003 (Exp.1; 1 mm entre rolos)	11,1; 27,8 e 39,7
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73601-7">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73601-7</a>	Johnson et al., 2003 (Exp.1; 15,9 mm entre rolos)	11,1; 27,8 e 39,7
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73601-7">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73601-7</a>	Johnson et al., 2003 (Exp.2; 1 mm entre rolos)	27,8 e 39,7
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73601-7">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73601-7</a>	Johnson et al., 2003 (Exp.2; 15,9 mm entre rolos)	27,8 e 39,7
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72961-1">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72961-1</a>	Soita et al., 2005	9,5 e 19
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72689-8">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72689-8</a>	Cooke e Bernard, 2005 (2 mm entre rolos)	19,5 e 25,4
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72689-8">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72689-8</a>	Cooke e Bernard, 2005 (8 mm entre rolos)	19,5 e 25,4
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72399-2">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72399-2</a>	Couderc et al., 2006	6 e 23
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72339-6">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72339-6</a>	Yang e Beauchemin, 2006	4,8; 15,9 e 28,6
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.2006-609">https://doi.org/10.3168/jds.2006-609</a>	Bhandari et al., 2007	10 e 19
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.2007-0810">https://doi.org/10.3168/jds.2007-0810</a>	Zebeli et al., 2008	5,5; 8,1 e 14
<a href="https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30423-X">https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30423-X</a>	Ferraretto e Shaver, 2012	19 e 30
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.2015-9543">https://doi.org/10.3168/jds.2015-9543</a>	Vanderwerff et al., 2015	19 e 26
<a href="https://www.landwirtschaftskammer.de/riswick/versuche/ergebnisse/shredlage-2016.htm">https://www.landwirtschaftskammer.de/riswick/versuche/ergebnisse/shredlage-2016.htm</a>	Pries e Bothe, 2016	7 e 26
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.2020-19428">https://doi.org/10.3168/jds.2020-19428</a>	Salvati et al., 2021	6; 12 e 18

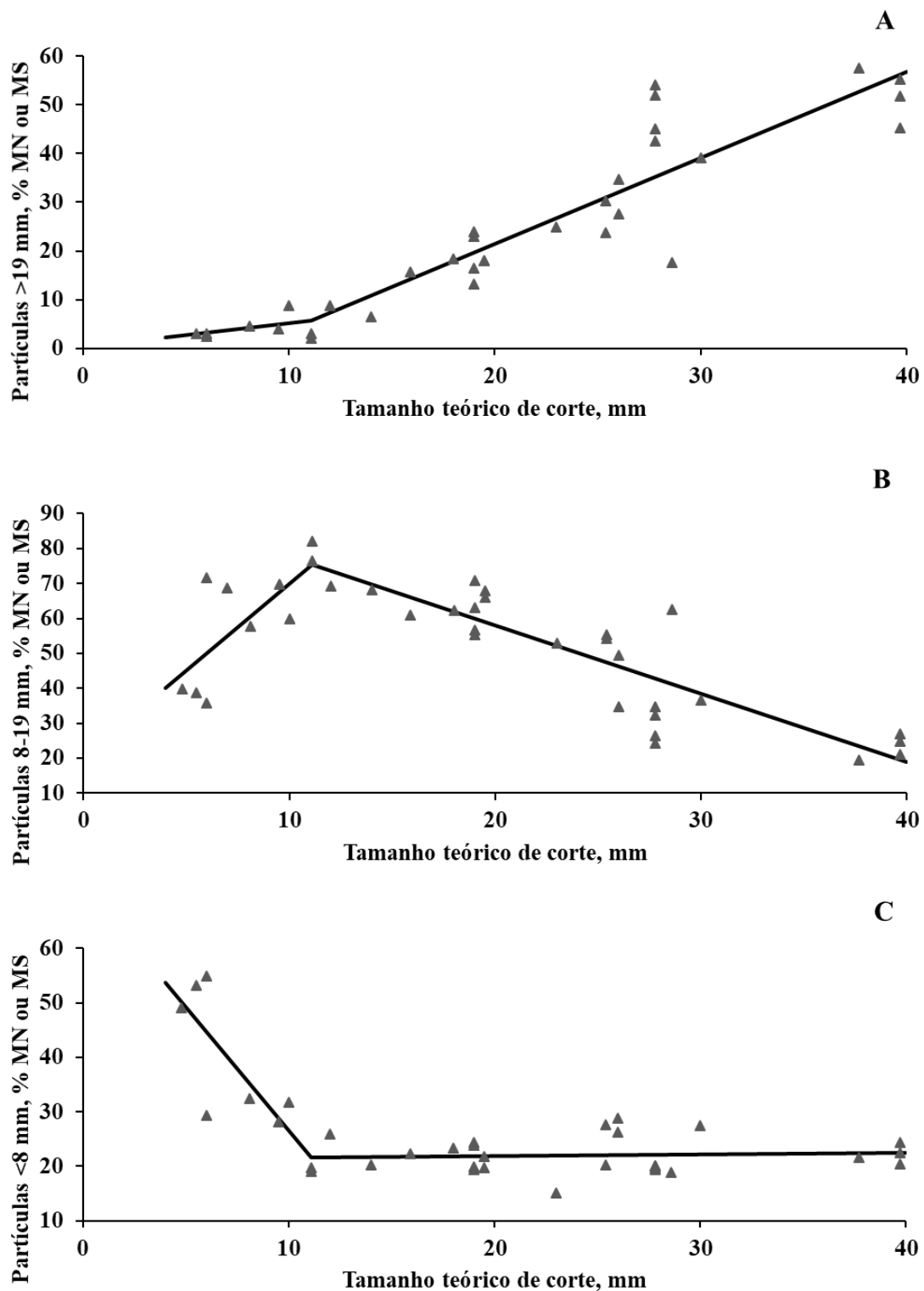
**Tabela 2.** Parâmetros das regressões segmentadas

Variável dependente (%MS ou MN)	Ponto de quebra para TTC (mm)	Intercepto	1ª inclinação	2ª inclinação	CCC <sup>1</sup>
Partículas >19 mm	11,1 (P=0,03)	0,230 (P=0,98)	0,487 (P=0,75)	1,77 (P<0,01)	0,92
Partículas 8-19 mm	11,1 (P<0,01)	20,2 (P=0,08)	4,97 (P<0,01)	-1,96 (P<0,01)	0,84
Partículas <8 mm	11,1 (P<0,01)	71,7 (P<0,01)	-4,51 (P<0,01)	0,028 (P=0,78)	0,87
fef <sub>&gt;8mm</sub>	11,1 (P<0,01)	31,5 (P<0,01)	4,24 (P<0,01)	-0,036 (P=0,74)	0,85
fef <sub>bio</sub>	7,57 (P<0,01)	39,9 (P<0,01)	6,18 (P<0,01)	-0,183 (P<0,01)	0,76

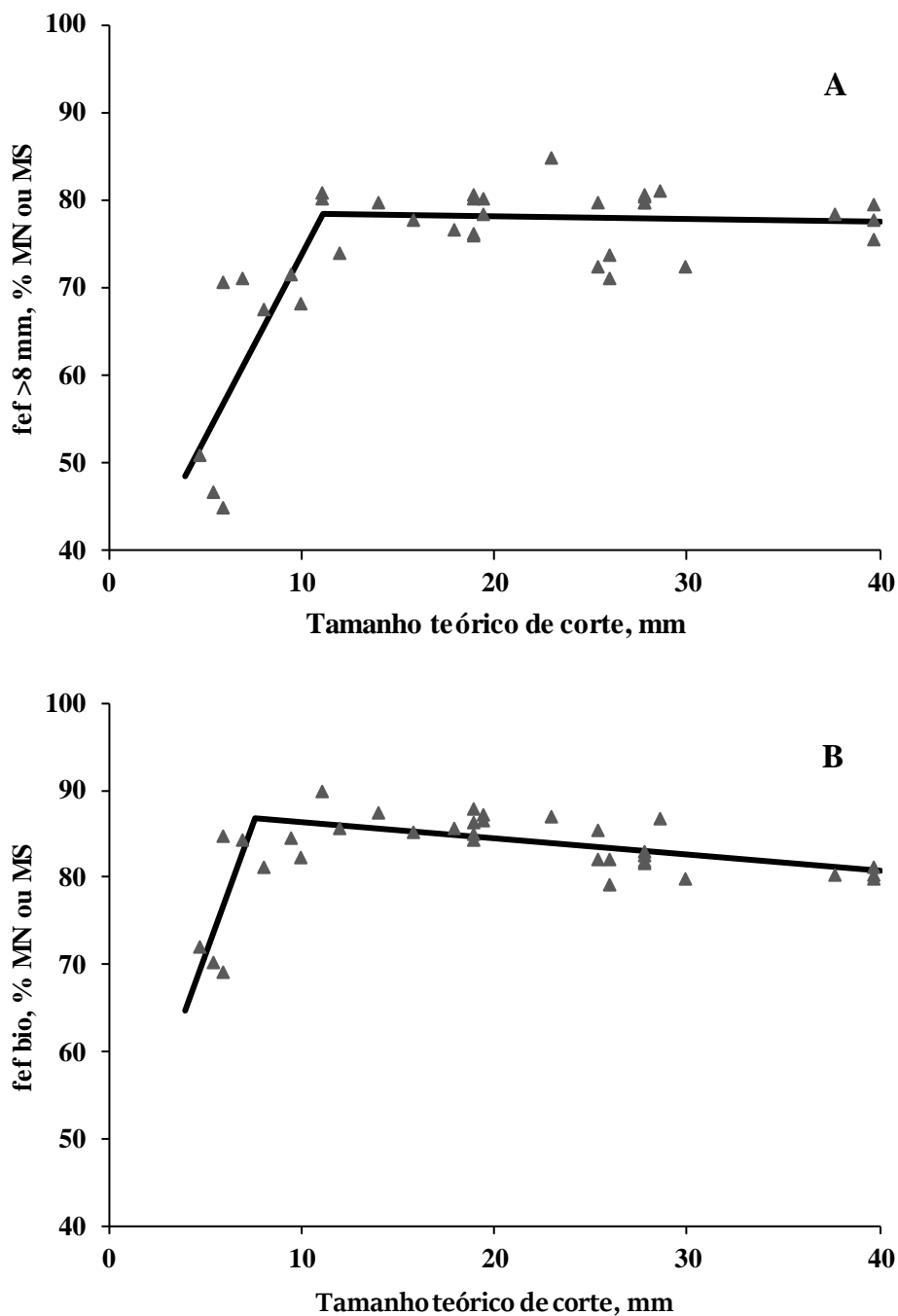
<sup>1</sup>Coefficiente de correlação de concordância.

Como observado na Figura 1, aumentar o TTC de 4,8 mm até 11,1 mm diminui a proporção de partículas <8 mm e aumentou as proporções retidas nas peneiras de 8 mm e 19 mm. No entanto, aumentos no TTC acima de 11,1 mm não alteraram a proporção de partículas <8 mm, mas aumentaram a retenção de partículas na peneira de 19 mm às custas da diminuição na proporção de partículas retidas na peneira de 8 mm.

Como reflexo das distribuições de partículas, aumentar o TTC de 4,8 mm até 11,1 mm aumentou os fatores de efetividade da silagem de milho (fef<sub>>8mm</sub> e fef<sub>bio</sub>) (Figura 2). Porém, TTC maiores que 11,1 mm ou 7,57 mm não foram capazes de proporcionar aumentos nos valores de fef<sub>>8mm</sub> e fef<sub>bio</sub>, respectivamente. Além de não resultar em incrementos nos fatores de efetividade física, a maior proporção de partículas >19 mm frequentemente aumenta o risco de seleção no cocho (Miller-Cushon et al., 2017, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11983>), podendo induzir consumo de FDNfe menor do que o formulado.



**Figura 1.** Relação entre tamanho teórico de corte (mm) e porcentagem de partículas retidas nas peneiras de 19 mm (A), 8 mm (B) e fundo (C) do PPS.



**Figura 2.** Relação entre tamanho teórico de corte (mm),  $f_{ef > 8\text{mm}}$  (A; calculado de acordo com Zebeli et al., 2012) e  $f_{ef\text{bio}}$  (B; calculado como apresentado no início desse tópico).

Finalmente, o TTC deve ser definido, em geral, para valores acima de 11,1 mm (a depender da colhedora), mas visando otimizar o processamento de grãos e evitando-se retenções excessivas na peneira de 19 mm. Atendendo-se ao ótimo processamento de grãos (e.g., escore de processamento de grãos > 70%), o TTC pode ser modulado para melhorar o rendimento de colheita e reduzir o consumo de combustível da colhedora. Embora a relação entre  $\text{TTC} > 11,1$  mm e % partículas > 19 mm seja positiva e linear, o

ótimo processamento de grãos pode ser alcançado com diferentes distribuições de partículas dependendo do rolo processador montado na colhedora autopropelida. Aparentemente, retenções <8% e <18% na peneira de 19 mm devem ser adequadas para rolos processadores convencionais e shreadlage, respectivamente (Heinrichs, 2013, <https://extension.psu.edu/penn-state-particle-separator>; Vanderwerff et al., 2015, ). A definição do TTC certamente dependerá da interação entre a máquina e a lavoura de milho.

A segunda pergunta prática que provém desta tese provavelmente é:

**“Utilizando-se os  $fe_{bio}$ , qual nível de FDN<sub>fe</sub> deve ser utilizado para vacas em lactação?”**

Para responder essa pergunta, novamente compilamos dados da literatura, da mesma forma descrita anteriormente. Nesse caso, os critérios de seleção das publicações foram: 1) a silagem de milho foi o único volumoso da dieta (i.e., trabalhos ou tratamentos com inclusão de outros volumosos, cascas ou caroço de algodão foram excluídos); 2) houve variação no teor de FDN<sub>fe</sub> da dieta via modificação do tamanho de partículas da silagem de milho (i.e., estudos com alteração da razão volumoso: concentrado foram excluídos) e 3) a estratificação de partículas no PSPS foi descrita para a TMR. Do total de 51 publicações encontradas, apenas 8 trabalhos atenderam aos critérios descritos anteriormente e foram mantidos no banco de dados (Tabela 3), resultando no total de 30 médias de tratamentos e 309 animais avaliados. As variáveis resposta compiladas foram: pH ruminal, tempo de mastigação (min/d), teor de gordura do leite (%), CMS (kg/d) e produção de leite (kg/d). Como variáveis independentes foram calculadas:

- 1) a razão  $FDN_{fe>8mm}$ : amido degradável no rúmen (amidoDR), utilizando o teor de FDN da TMR (% MS) e o fator de efetividade física com base nas retenções de partículas (% MN) da TMR nas peneiras de 8 mm e 19 mm ( $fe_{>8mm}$ ; Zebeli et al., 2012, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4421>);
- 2) a razão  $FDN_{fe_{bio}}$ : amidoDR, utilizando o teor de FDN da TMR (% MS) e o fator de efetividade física com base nas retenções de partículas (% MN) da TMR ponderado para a efetividade de cada peneira ( $fe_{bio}$ ; como descrito acima).

O teor de amidoDR foi estimado com modelo exponencial com 1-pool e cinética de primeira ordem [i.e., desaparecimento ruminal =  $kd / (kd + kp)$ ], assumindo  $kp = 7\%/h$ . As fontes de amido nas dietas foram classificadas como: amido de degradação rápida (silagem de milho, cevada, farelo de trigo; assumindo  $kd = 28\%/h$ , ou seja, degradabilidade ruminal de aproximadamente 80%) ou amido de degradação lenta (milho



seco, DDG, farelo de glúten de milho; assumindo  $k_d = 9 \text{ %/h}$ , ou seja, degradabilidade ruminal de aproximadamente 55%). Quando o teor de amido do ingrediente não foi reportado, foi assumido teor de amido igual ao valor médio publicado nas tabelas do NASEM (2016, <http://dx.doi.org/10.17226/25806>).

Os dados foram modelados com regressão segmentada utilizando o procedimento NLMIXED do SAS (Robbins et al., 2006, [http://dx.doi.org/10.2527/2006.8413\\_supple155x](http://dx.doi.org/10.2527/2006.8413_supple155x)). O modelo utilizado foi o seguinte: Se  $X$  (medida de FDNfe: amidoDR)  $\leq B$ , então  $Y = I + S1 \times X$ ; se  $X > B$  então  $Y = (I + S1 \times X) + S2 \times (X - B)$ ; em que:  $B$  = valor de  $X$  para o ponto de quebra,  $Y$  = variável resposta,  $I$  = intercepto,  $S1$  = inclinação do primeiro seguimento,  $S2$  = inclinação do segundo seguimento. O modelo também incluiu o efeito aleatório de experimento. Quando o modelo não convergiu, a variável resposta foi regredida contra as razões de FDNfe: amidoDR utilizando modelo linear ou quadrático. A adequação dos modelos foi comparada pelo coeficiente de correlação de concordância (CCC) e pelo coeficiente de correlação de concordância não corrigido (uCCC; dados não ajustados para efeito aleatório de experimento).

As TMR sumarizadas apresentaram retenções (% da MS ou MN) que variaram de 2,30 a 18,5% para a peneira de 19 mm, de 21,5 a 65,3% para a peneira de 8 mm e 31,75 a 71,5% para o fundo. Os teores de FDN total das TMR variaram de 28,5 a 33,5%, amido total de 25,9 a 37,4% e amidoDR de 18,0 a 26,8% da MS. Para as variáveis resposta, o pH ruminal variou de 5,49 a 6,47, o tempo de mastigação de 605 a 860 min/d, o teor de gordura do leite de 2,67 a 4,30%, o CMS de 15,5 a 28,0 kg/d e a produção de leite de 22,9 a 49,3 L/d.

As razões FDNfe: amidoDR apresentaram relação linear positiva com o pH ruminal, o tempo de mastigação e o teor de gordura do leite, indicando que as razões FDNfe: amidoDR estiveram associadas positivamente à saúde ruminal (Figura 3 e Tabela 4). Por outro lado, as respostas em CMS e produção do leite foram dependentes da magnitude da razão FDNfe: amidoDR. Partindo de dietas deficientes em FDNfe ou com excesso de amidoDR, incrementos na razão FDNfe: amidoDR aumentaram o CMS e a produção de leite. No entanto, a partir de certo ponto, aumentos na razão FDNfe: amidoDR deprimiram o CMS e a produção de leite, claramente indicando efeito de enchimento físico do trato gastrintestinal causado pelo excesso de FDNfe.

É válido notar que, dentro de um mesmo modelo, maiores valores da razão FDNfe: AmidoDR foram encontrados para otimização das variáveis indicativas de saúde ruminal (i.e., pH ruminal, tempo de mastigação e teor de gordura do leite) comparativamente às

variáveis indicadoras de enchimento ruminal (CMS e produção de leite). Esses achados condizem com os resultados apresentados por Zebeli et al. (2012; vide Figura 2 naquela publicação; <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4421>), em que o nível de FDN<sub>fe>8mm</sub> capaz de maximizar a saúde ruminal foi superior ao nível para máximo CMS, demonstrando que provavelmente não há ponto exato de convergência para saúde ruminal e desempenho produtivo.

**Tabela 3.** Estudos sumarizados nesta revisão sobre os efeitos das razões entre FDN fisicamente efetivo e amido degradável no rúmen sobre as respostas de vacas leiteiras

DOI	Referência
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73838-7">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73838-7</a>	Kononoff e Heinrichs, 2003
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73937-X">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73937-X</a>	Kononoff et al., 2003
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72888-5">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72888-5</a>	Beauchemin e Yang, 2005
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72961-1">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72961-1</a>	Soita et al., 2005
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72776-4">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72776-4</a>	Yang e Beauchemin, 2005
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72399-2">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72399-2</a>	Couderc et al., 2006
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72339-6">https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72339-6</a>	Yang e Beauchemin, 2006
<a href="https://doi.org/10.3168/jds.2020-19428">https://doi.org/10.3168/jds.2020-19428</a>	Salvati et al., 2021

Considerando os valores de CCC e uCCC, os modelos com a razão FDN<sub>fe<sub>bio</sub></sub>: AmidoDR apresentaram melhores ajustes (precisão e acurácia) do que FDN<sub>fe>8mm</sub>: AmidoDR. Esse resultado reflete as diferenças conceituais entre as formas de calcular FDN<sub>fe</sub>. O FDN<sub>fe<sub>bio</sub></sub> considera a efetividade de partículas finas (<8 mm), seja FDN de forragem ou de concentrado. Outra diferença conceitual está no feq de partículas retidas na peneira de 19 mm (0,79 para o modelo FDN<sub>fe<sub>bio</sub></sub> vs. 1,00 para o modelo FDN<sub>fe>8mm</sub>).

No experimento apresentado no capítulo anterior, os teores calculados de FDN<sub>fe<sub>bio</sub></sub> foram de 19,4% para a dieta CN, 22,3% para dieta contendo a fração da silagem de milho <8 mm, 26,9% para a dieta contendo a fração da silagem de milho com 8-19 mm e 25,5% para a dieta contendo a fração da silagem de milho >19 mm. Considerando o teor estimado de amidoDR, as razões FDN<sub>fe<sub>bio</sub></sub>: AmidoDR foram 0,91, 1,19, 1,45 e 1,42, respectivamente. Ao observarmos o tempo em que o pH ruminal permaneceu abaixo de 5,8, é possível constatar que somente a dieta CN resultou em acidose ruminal subaguda (razão FDN<sub>fe<sub>bio</sub></sub>: AmidoDR < 1). Assim, com base nos resultados obtidos no capítulo anterior e nesta “mini meta-análise”, valores ≥1 para a razão FDN<sub>fe<sub>bio</sub></sub>: AmidoDR aparentam ser adequados para manter a saúde ruminal em vacas leiteiras alimentadas com dietas formuladas com base em silagem de milho, mas, estudos futuros devem ser conduzidos para ratificar o valor. Deve-se considerar que incrementos excessivos de

FDNfe na dieta podem resultar em depressão de CMS e desempenho produtivo (Zebeli et al., 2012, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4421>).

**Tabela 4.** Respostas de vacas leiteiras consumindo dietas com silagem de milho como única fonte de forragem, com FDN<sub>fe</sub> variando com alterações no tamanho de partícula da silagem de milho

Item	pH ruminal		Mastigação, min/d		Gordura, %		CMS, kg/d		Leite, kg/d	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Modelo <sup>1,2</sup> n°										
Intercepto	5,74	5,36	545	426	3,24	2,61	21,4	-26,2	36,0	43,5
P-valor	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,07	<0,01	<0,01
L	0,426	0,684	275	315	0,409	0,936	7,75			-6,71
P-valor	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,03			<0,01
Q							-7,32			
P-valor							<0,01			
S1								65,0	3,62	
P-valor								<0,01	0,59	
S2								-4,16	-5,13	
P-valor								<0,01	<0,01	
B (X)								0,77	0,55	
P-valor								<0,01	<0,01	
Vértice (X)								0,53		
Valor de X para igualar a Y <sup>3</sup>	0,61	0,94			0,63	0,95				
N	18	18	18	18	22	22	30	30	22	22
CCC	0,91	0,93	0,94	0,88	0,58	0,81	0,63	0,77	0,66	0,84
uCCC	0,34	0,45	0,12	0,16	0,22	0,34	-0,06	0,01	0,02	0,10

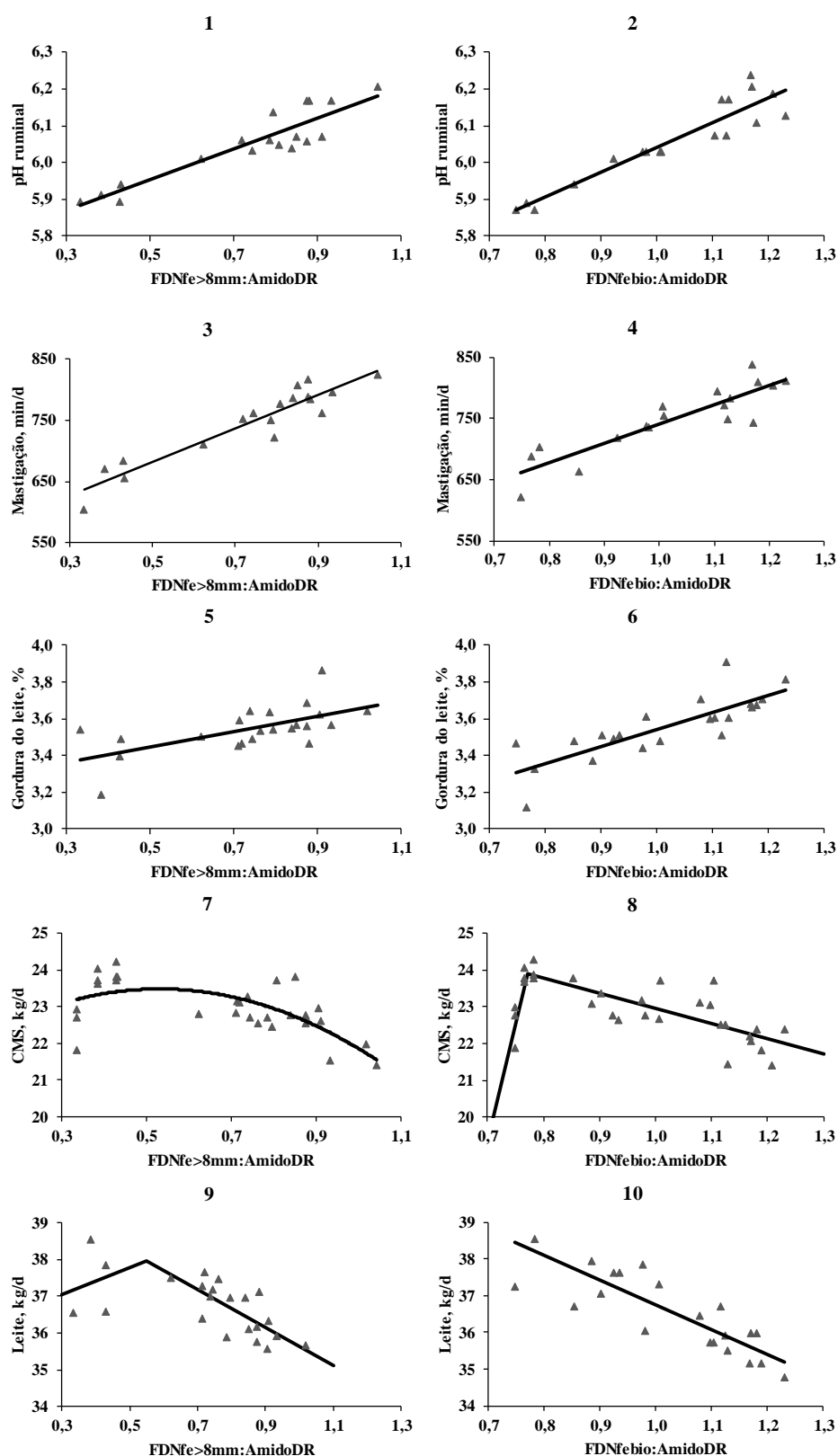
<sup>1</sup>Os modelos avaliados correspondem à razão FDN<sub>fe>8mm</sub>: AmidoDR (modelos n° 1, 3, 5, 7 e 9) e à razão FDN<sub>febio</sub>: AmidoDR (modelos n° 2, 4, 6, 8 e 10).

<sup>2</sup>Modelos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 10:  $Y = \text{Intercepto} + L \times X$ .

<sup>2</sup>Modelos 8, 9: Se  $X \leq B$ , então  $Y = \text{Intercepto} + S1 \times X$ ; se  $X > B$ , então  $Y = (\text{Intercepto} + S1 \times X) + S2 \times (X - B)$ .

<sup>2</sup>Modelo 7:  $Y = \text{Intercepto} + L \times X + Q \times X^2$ .

<sup>3</sup>pH = 6,0; %Gordura = 3,5.



**Figura 3.** Relações entre as razões FDN<sub>fe>8mm</sub>: AmidoDR, FDN<sub>febio</sub>: AmidoDR e o pH ruminal (1 e 2), o tempo de mastigação (3 e 4), o teor de gordura do leite (5 e 6), o CMS (7 e 8) e a produção de leite (9 e 10). Vide Tabela 4 para os parâmetros dos modelos.