

Estudio *in vitro* de la viabilidad de células Caco-2 en presencia de componentes del aceite esencial de *Allium spp*

Llana Ruiz-Cabello M, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Pichardo S*, Jos A, Cameán AM

Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. C/ Profesor García González 2, 41012 Sevilla, España.

Recibido 25 de septiembre de 2013 / Aceptado 20 de diciembre de 2013

Resumen: El aceite esencial de los componentes del género *Allium*, principalmente ajo y cebolla, presenta propiedades antioxidantes y antibacterianas debidas a la presencia de compuestos azufrados en su composición. La industria alimentaria ha comenzado a desarrollar nuevos sistemas de envasado activo a partir de polímeros seleccionados, a los que se incorporan aceites esenciales que, por sus propiedades, contribuyen a aumentar la vida útil de los alimentos perecederos. En este sentido, se hace necesario evaluar la seguridad asociada al uso de estas sustancias en envases alimentarios que van a estar en contacto con el consumidor a través del alimento. El objetivo del presente estudio fue determinar la citotoxicidad producida por dipropil sulfuro y dipropil disulfuro, dos de los componentes del aceite esencial de ajo y cebolla, en la línea celular Caco-2, células humanas procedentes de carcinoma de colon. Los biomarcadores ensayados fueron el contenido total de proteínas, la captación de rojo neutro y la reducción de la sal de tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4sulfofenil)-2H-tetrazolio). Las células fueron expuestas durante 2, 4 y 8 h a concentraciones comprendidas entre 0 y 200 μ M. Los resultados no mostraron diferencias significativas frente al control para ninguno de los tres marcadores, lo que demuestra que bajo las condiciones de los ensayos ambos compuestos azufrados no son citotóxicos para esta línea celular gastrointestinal y podrían ser útiles en la industria alimentaria para desarrollar envases activos.

Palabras clave: aceite esencial de *Allium spp.*, citotoxicidad, dipropil sulfuro, dipropil disulfuro, Caco-2

Abstract: *In vitro* study of the viability of Caco-2 cells in presence of two compound of *Allium spp* essential oil. *Allium spp.* essential oil, mainly from garlic and onion, possesses different beneficial properties, for example antioxidant and antimicrobial effects, due to the presence of sulfur compounds. Food industry is developing new active packaging systems that include the essential oil of garlic in their structure, in order to improve the shelf-life of perishable products. Therefore it is necessary to evaluate the safety associated with the use of these substances in food packaging that will be in contact with the consumer through food. The aim of our study was to evaluate *in vitro* the cytotoxicity of dipropyl sulfide and dipropyl disulfide. For this purpose, we used the human Caco-2 cell line, from human small intestinal mucosa carcinoma. The assayed cytotoxicity biomarkers were the total protein content, neutral red uptake and reduction of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboximethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt. Cells were exposed to dipropyl sulfide and dipropyl disulfide in concentrations between 0-200 μ M for 2, 4 and 8 h. After periods of exposure, no alterations were observed in any of the biomarkers

assayed. These results suggest that both organosulfur compounds are safety options for food industry and could be a choice in the development of active packaging.

Keywords: *Allium spp* essential oil, cytotoxicity, dipropyl sulfide, dipropyl disulfide, Caco-2.

Introducción

El ajo (*Allium sativum*) y la cebolla (*Allium cepa*) se han utilizado tradicionalmente por sus propiedades farmacológicas y terapéuticas [1-3], sobre todo en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares [4], inflamación [5,6], carcinogénesis [7,8] e infecciones víricas [9] o bacterianas [10,11].

Los aceites esenciales de ajo y cebolla se obtienen mediante un proceso de destilación por arrastre de vapor. La cantidad y variedad de compuestos azufrados que forman parte de la composición de este aceite puede variar en función de distintos factores como son, el proceso de extracción o la madurez del bulbo [12,13]. Se ha observado que, los aceites de ajo y cebolla, pueden inhibir el crecimiento de células tumorales *in vitro* [14], inducir enzimas que intervienen en la detoxificación de xenobióticos [15,16]; e incluso el aceite de ajo es capaz de activar mecanismos de apoptosis [17]. El interés en estos aceites esenciales dentro del ámbito alimentario radica en la creciente preocupación, por parte de los consumidores, del uso de conservantes, antioxidantes y antibacterianos artificiales en los alimentos. Para responder a esta inquietud, comienzan a desarrollarse en Europa los denominados envases activos, que incorporan sustancias naturales con el fin de preservar los alimentos.

Según el Reglamento (CE) No 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos [18], los envases activos son "materiales y objetos destinados a ampliar el tiempo de conservación, o a mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados, y que están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que transmitan sustancias a los alimentos envasados o al entorno de éstos o que absorban sustancias de los alimentos envasados o del entorno de éstos". La liberación de sustancias desde el envase al alimento no debe provocar una modificación inaceptable de la composición del alimento en virtud del reglamento citado anteriormente. Por ello, se permite la fabricación de materiales plásticos que no liberen más de 10 mg de sustancias por dm^2 de la superficie del material plástico [19].

La posible incorporación del aceite esencial de ajo o cebolla, por las propiedades descritas anteriormente, a polímeros plásticos para desarrollar estos nuevos envases, hace necesario estudiar la seguridad derivada de su uso en la industria alimentaria. Amagase [20] atribuyó

*e-mail: spichardo/us.es

a los compuestos azufrados del ajo sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos son derivados de la descomposición de la alicina [21] y presentan una gran variabilidad, destacando el dialil sulfuro (dAS), dialil disulfuro (dAdS) y dialil trisulfuro (dATS) [22] como componentes mayoritarios; frente a otros, menos abundantes, como el dipropil sulfuro (dPS) y dipropil disulfuro (dPdS) cuyas estructuras constan de uno y dos átomos de azufre respectivamente (Fig 1) [23]. No obstante, ambos compuestos son componentes principales de la cebolla, siendo el dPdS el componente mayoritario de su aceite esencial [24].

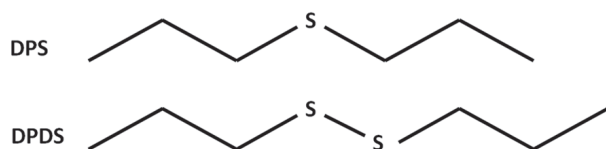


Figura 1. Estructuras químicas del dipropil sulfuro y dipropil disulfuro [23]

Las propiedades de los derivados alilos han sido ampliamente estudiadas y existe una abundante bibliografía que demuestra la capacidad de estos compuestos para inducir apoptosis *in vitro* en una gran variedad de tipos celulares como son las células de carcinoma de colon HCT-15 [25], Caco-2 y HT-29 [26], de cáncer de mama MCF-7 [27], de cáncer de próstata PC-3 y DU145 [28] o las de cáncer de tiroides anaplásico ATC [29]. Además, Tsai y col. [30] muestran la capacidad antioxidante del dATs frente a las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas en miocitos cardíacos (H9c2) expuestos a altas concentraciones de glucosa. Por otro lado, Yin y col. [31] reportaron el efecto antioxidante no mediado por enzimas del dAS y dAdS como potenciales componentes de envases alimentarios. Asimismo, la actividad antibacteriana de los alilos frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* también ha sido demostrada [32].

Con respecto a los compuestos minoritarios en el aceite de ajo, como el dPS y el dPdS, los estudios son más escasos, habiéndose encontrado que ambos disminuyen el daño oxidativo producido en el ADN tras la exposición de N-nitrosaminas en células HepG2 [33]. Además, se ha observado que el dPdS presenta efectos antiapoptóticos en células HepG2 expuestas a N-nitrosaminas [34].

Teniendo en cuenta la escasa bibliografía publicada hasta el momento acerca de los efectos que producen los componentes dipropilos de los aceites de ajo y cebolla, dPS y dPdS, éstos fueron el objetivo de nuestro estudio. Con el fin de evaluar la seguridad derivada de su uso en el envasado de alimentos, se seleccionó la línea celular intestinal humana Caco-2. Por todo ello, el objetivo del presente trabajo fue realizar un screening de la citotoxicidad *in vitro* del dPS y dPdS tras 2, 4 y 8 horas de exposición en las células Caco-2.

Material y métodos.

Materiales y productos químicos

El medio de cultivo Eagle Minimum Essential Medium (EMEM), suero bovino fetal y aminoácidos no esenciales (AANE) fueron proporcionados por BioWittaker (Lonza, Verviers, Bélgica) y la L-glutamina, gentamicina y piruvato sódico por Gibco (Paisley, Reino Unido). Los compuestos azufrados (dPS y dPdS) fueron suministrados por Sigma Aldrich (Madrid, España). El resto de reactivos y materiales empleados se obtuvieron de Termo Fisher Scientific (Dinamarca), Sigma Aldrich (Madrid, España), VWR

International EuroLab (Madrid, España) y BioRad (Madrid, España).

Modelo celular

La línea celular Caco-2, derivada de un adenocarcinoma de colon humano (ATCC® HTB-37), se mantuvo a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5% y un 95% de humedad relativa (CO₂ incubator, NuAire®, España) en medio EMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato sódico, 2 mM de L-glutamina y 50 µg/mL de gentamicina. Las células se mantuvieron hasta confluencia en frascos de plástico de 75 cm² estériles. Los pases celulares de trabajo se encontraban entre el 14 y 19.

Ensayos de citotoxicidad basal

Para los ensayos de citotoxicidad, las células Caco-2 se sembraron en placas de 96 pocillos a la densidad de $7,5 \cdot 10^5$ cel/mL, y se incubaron durante 24 h a las condiciones adecuadas. Transcurrido este tiempo, se procedió a la exposición de las células. Las soluciones de dPS y dPdS se prepararon en medio de cultivo EMEM, sin suero bovino fetal, a partir de una disolución stock de dPS y dPdS en 0.1% DMSO. Se prepararon disoluciones seriadas para la exposición de manera que la concentración final de DMSO fuera inferior al 0,1%. Las concentraciones de exposición se calcularon teniendo cuenta el porcentaje de estos compuestos en el aceite esencial de cebolla (0-20%) y la cantidad de aceite que se podría emplear en la elaboración de envases activos. Dichas concentraciones de exposición fueron 0,25; 0,5; 1; 10; 20; 50; 100; 200 µM para ambos compuesto azufrados, además de un grupo control sin la presencia de ninguno de los compuestos objeto de estudio y otro con una concentración 0,1% en DMSO. Una vez expuestas, las células se incubaron durante 2, 4 y 8 h a 37°C. Dichos tiempos de exposición fueron seleccionados con el fin de realizar una estimación más realista del daño que una ingestión de los compuestos azufrados puede provocar en las células intestinales durante el proceso digestivo.

Los diferentes ensayos de citotoxicidad basal realizados fueron la estimación del contenido proteico total (PT), la reducción de la sal de tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4sulfofenil)-2H-tetrazolio) (MTS) y la captación del colorante rojo neutro (RN).

El ensayo de PT se realizó según el protocolo de Bradford [35] que utiliza Azul brillante de Coomassie G-250 para determinar el número total de células presentes. La absorbancia se midió a 595nm en el lector de placas Infinity 200 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). El ensayo RN permite determinar la viabilidad celular. Se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Borenfreund y Puerner [36]. La reducción de MTS se realiza siguiendo el procedimiento de Baltrop y col. [37] y es llevada a cabo por deshidrogenasas presentes en la mitocondria.

Cálculos y análisis estadístico

Los experimentos se llevaron a cabo tres veces con sextuplicados para cada concentración. Los datos se representan como porcentaje con respecto al grupo control \pm sus respectivas desviaciones estándar (DE).

El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA), seguido del test de Dunnet, utilizando el programa GraphPadInStat software (GraphPadSoftware Inc., La Jolla, EE.UU.)

Resultados

Tras incubar las células Caco-2 a concentraciones entre 0 y 200 μM de dPS se midieron tres biomarcadores de la viabilidad celular. Los resultados obtenidos se compararon con un control, no expuesto a dPS, al que se le asignó el valor de 100% de viabilidad. Después de 2, 4 y 8 h de exposición, el número de células vivas, mediante la cuantificación de PT, relacionadas directamente con la proliferación celular, no experimentó cambios significativos en todas las concentraciones ensayadas con respecto al grupo control (Fig 2A). Para todos los tiempos y concentraciones de exposición, el ensayo de RN, basado en la incorporación del colorante supravital rojo neutro a los lisosomas de células viables no dañadas, mostró valores de viabilidad cercanos al 100% (Fig 2B). Así mismo, la reducción de MTS, indicador del grado de afectación de las mitocondrias, se comportó de forma similar al contenido proteico y RN, sin experimentar cambios en la proliferación celular con respecto al control (Fig 2C).

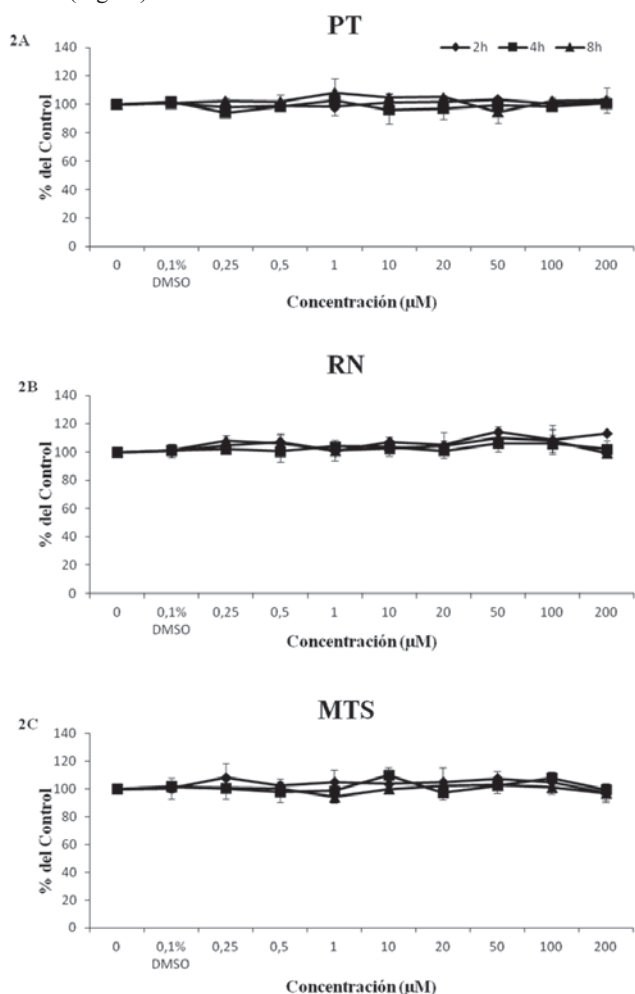


Figura 2. Contenido proteico total (A), Captación de Rojo Neutro (B) y Reducción de la sal de tetrazolio MTS (C) en células Caco-2 expuestas a dPS durante 2, 4 y 8 h. Valores expresados como media \pm DE.

De forma similar, las células Caco-2 expuestas a dPdS a las mismas condiciones de exposición que su homólogo sulfurado, no sufrieron ningún efecto tóxico. El contenido proteico no experimentó alteraciones significativas con respecto al grupo control (Fig. 3A). Igualmente, ni el ensayo de RN (Fig. 3B) ni la reducción de MTS (Fig.

3C) mostraron afectación notable a ninguna concentración ni tiempo de exposición ensayados para el dPdS.

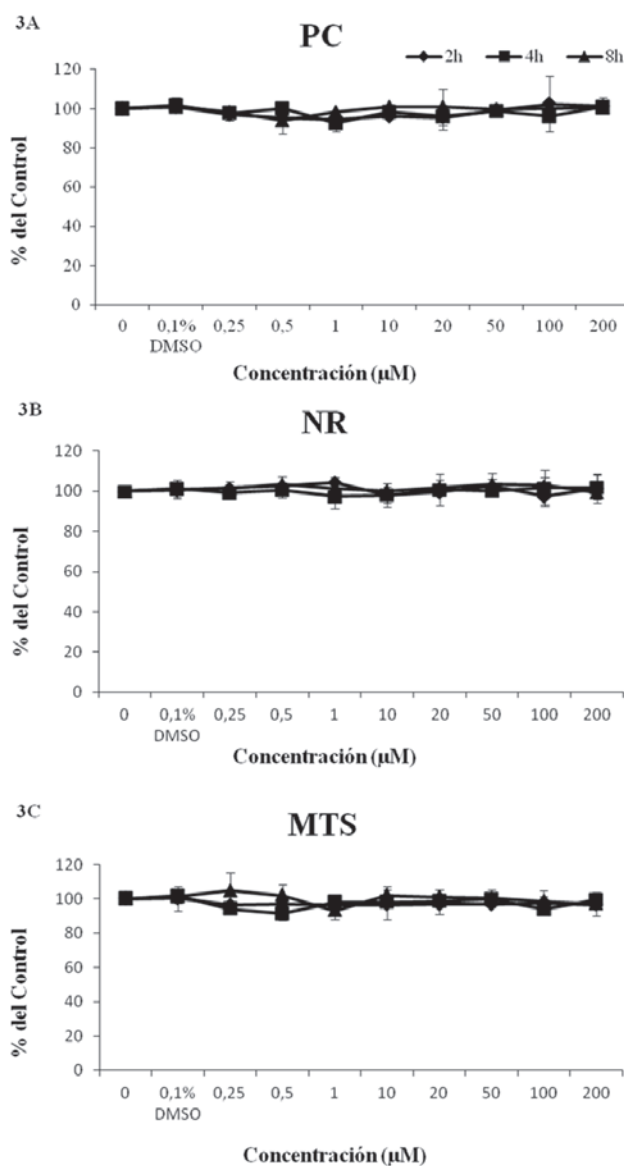


Figura 3. Contenido proteico total (A), Captación de Rojo Neutro (B) y Reducción de la sal de tetrazolio MTS (C) en células Caco-2 expuestas a dPS durante 2, 4 y 8 h. Valores expresados como media \pm DE.

Discusión

Las investigaciones realizadas concernientes a los efectos producidos por los compuestos dPS y dPdS son muy escasas y no existen datos de migración de estos compuestos desde el envase al alimento. Como consecuencia, teniendo en cuenta el peor escenario posible de exposición, la máxima concentración ensayada fue superior a la concentración prevista en el envase para asegurar que, en el rango real de uso, el compuesto sea seguro. En nuestro estudio, los marcadores de citotoxicidad ensayados, no revelaron cambios significativos a ninguna de las concentraciones estudiadas (0-200 μM dPS). Del mismo modo, Xiao y col. [28] no encontraron una disminución de la viabilidad celular al estudiar el biomarcador Sulforhodamina B,

similar al ensayo de PT que determina la cantidad de proteínas, en células de cáncer de próstata PC-3 expuestas a dPS (0-160 μM) durante 24 h. Así mismo, tras la exposición de las células Caco-2 a su homólogo propílico, el dPdS, no se manifestaron efectos citotóxicos. En este sentido, Sundaram y Milner [25], tras exponer a 100 μM de dPdS durante 24h a células de cáncer de colon HTC-15, piel SK MEL-2 y pulmón A549, no observaron disminución de la viabilidad en las diferentes líneas celulares. Así mismo, Mehri y col. [38] demostraron la ausencia de citotoxicidad en células de leucemia mieloide aguda U937 expuestas a un rango de 0-100 μM de dPdS durante 72 h.

Na y col. [27] estudiaron el efecto de un análogo estructural del dPS, el dAS, que difiere del primero por la presencia de dos dobles enlaces, sobre el biomarcador MTT en células de cáncer de mama (MCF-7) expuestas a una concentración 50 μM de dAS durante 48 h, tras las cuales no se observaron alteraciones. Estos resultados coinciden con los observados en nuestro caso para el biomarcador MTS en células Caco-2 tras la exposición a dPS. Por el contrario, Hong y col. [39] observaron efectos citotóxicos para este compuesto por reducción de MTT tras la exposición de dos líneas celulares de cáncer de pulmón (H460 y H1299) a 25 μM de dAS durante 1 h. Además, Shin y col. [29] también demostraron una disminución de la viabilidad celular en células cancerígenas de tiroides (ARO) expuestas a dAS (0-400 μM) durante 24 h. Por tanto, los dobles enlaces presentes en la estructura del dAS podrían incrementar la toxicidad de este compuesto en comparación con el dPS, si bien se ha observado que no produce daños en todas las líneas celulares, por lo que también podrían deberse a la distinta sensibilidad de cada una de ellas frente a estos compuestos.

Por otro lado, Fukao y col. [40] sugirieron que el número de átomos de azufre juega un papel crucial en las actividades biológicas, siendo el dialil trisulfuro (dAtS) el principal responsable de la protección frente a tetracloruro de carbono (CCl_4) en experimentos *in vitro*. En este sentido, se ha demostrado que la actividad de los organosulfurados está directamente relacionada con el número de átomos de azufre que presenta el compuesto [41]. Jakubíková y Sadlák [26] comprobaron que, de los derivados alilos, el compuesto con mayor citotoxicidad es el dAtS, seguido del dAdS y del dAS en las células Caco-2 y HT-29 por lo que cabría esperar que el dPS sea, de los derivados propilos, el menos citotóxico. No obstante, en nuestro estudio ambos compuestos mostraron ausencia de efectos tóxicos.

Nuestro estudio muestra la ausencia de citotoxicidad de ambos compuestos azufrados, dPS y dPdS, en células de adenocarcinoma de colon humano Caco-2. Constituye el primer paso para la idoneidad del empleo de dichos compuestos en envases destinados a la industria alimentaria.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Ministerio de Ciencia e innovación (AGL2012-38357-C02-01) y a la Junta de Andalucía (AGR-7252) por la financiación de este estudio y al Servicio de Biología del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) por su apoyo técnico.

Bibliografía

- Agarwal K (1996) Therapeutic actions of garlic constituents. *Med Res Rev* 16(1): 111-124.
- Reuter HD (1995) *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 2. Pharmacology and medicinal application. *Phytomedicine* 2(1): 73-91.
- Corzo-Martínez M, Corzo N, Villamiel M (2007) Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci Technol* 18: 609-625.
- Rahman K, Lowe GM (2006) Garlic and cardiovascular disease: a critical review. *J Nutr* 136: 736S-740S.
- Wilson E, Demming-Adams B (2007) Antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties of garlic and onions. *NFS* 37: 178-183.
- Takahashi M, Shibamoto T (2008) Anti-inflammatory Activities of Steam Distillate from Freeze-Dried Onion (*Allium cepa* L.) Sprout. *J. Agric. Food Chem.* 56: 10462-10467.
- Galeone C, Pelucchi C, Levi F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, Giacosa A, La Vecchia C (2006) Onion and garlic use and human cancer. *Am J Clin Nutr* 84: 1027-1032.
- Shon M-Y, Choi S-D, Kahng G-G, Nam S-H, Sung N-K (2004) Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. *Food Chem Toxicol* 42: 659-666.
- Romeilah R, Fayed S, Mahmoud G (2010) Chemical compositions, antiviral and antioxidant activities of seven essential oils. *J Appl Sci Res* 6: 50-62.
- Benklebia N (2010) Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm Wiss u Technol* 37: 263-268.
- Ye C-H, Dai D-H, Hu W-L (2013) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). *Food Control* 30: 48-53.
- Fenwick GR, Hanley AB (1985) The genus *Allium*. Part 2. *Crit Rev Food Sci Nutr* 22: 273-377.
- Lanzotti V (2006) The analysis of onion and garlic. *J Chromatograph A* 1112: 3-22.
- Seki T, Tsuji K, Hayato Y, Tadaaki M, Ariga T (2000) Garlic and onion oils inhibit proliferation and induce differentiation of HL-60 cells. *Cancer Lett* 160: 29-35.
- Chen C, Pung D, Leong V, Hebbar V, Shen G, Nair S (2004) Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor NRF2: Effect of chemical structure and stress signals. *Free Radicals Biol Med* 37: 1578-1590.
- Kim J, Kim J-S, Park E (2013) Cytotoxic and anti-inflammatory effects of onion peel extract on lipopolysaccharide stimulated human colon carcinoma cells. *Food Chem Toxicol* 62: 199-204.
- De Martino A, Filomeni G, Aquilano K, Ciriolo MR, Rotilio G (2006) Effects of water garlic extracts on cell cycle and viability of HepG2 hepatoma cells. *J Nutr Biochem* 17: 742-749.
- Reglamento CE nº 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE.
- Directiva 90/128/CEE de la Comisión, de 23 de febrero de 1990, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimentarios.

20. Amagase H (2006) Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic. *J Nutr* 136: 716S-725S.
21. Brodnitz MH, Pascale JV, van Derslice LJ (1971) Flavor components of garlic extract. *J Agric Food Chem* 19: 273-275.
22. Shukla Y, Kalra N (2007) Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. *Cancer Lett* 247: 167-181.
23. Siess M-H, Le Bon A-M, Canivenc-Lavier M-C, Suschetet M (1997) Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rats treated with allyl sulfides. *Cancer Lett* 120: 195-201.
24. Shaath NA, Flores FB (1998) Egyptian onion oil. *Develop Food Sci* 40: 443-453.
25. Sundaram S, Milner J (1996) Diallyl disulfide induces apoptosis of human colon tumor cells. *Carcinogenesis* 17: 669-673.
26. Jakubíková J, Sedlák J (2006) Garlic-derived organosulfides induce cytotoxicity, apoptosis, cell cycle arrest and oxidative stress in human colon carcinoma cell lines. *Neoplasma* 53: 191-199.
27. Na H-K, Kim E-H, Choi M-A, Park J-M, Kim D-H, Suth Y-J (2012) Diallyl trisulfide induces apoptosis in human breast cancer cells through ROS-mediated activation of JNK and AP-1. *Biochem Pharmacol* 84: 1241-1250.
28. Xiao D, Choi S, Johnson D, Vogel V, Johnson C, Trump D, Lee Y, Singh S (2004) Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulates kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. *Oncogene* 23: 5594-5606.
29. Shin HA, Cha YY, Park MS, Kim JM, Lim YC (2010) Diallyl sulfide induces growth inhibition and apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells by mitochondrial signaling pathway. *Oral Oncol* 46: 15-18.
30. Tsai C-Y, Wang C-C, Lai T-Y, Tsu T-Y, Wang C-H, Liang H-Y, Kuo W-W (2013) Antioxidant effects of diallyl trisulfide on high glucose-induced apoptosis are mediated by the PI3K/Akt-dependent activation of Nrf2 in cardiomyocytes. *Int J Cardiol* 168: 1286-1297.
31. Yin M-C, Hwang S-W, Chan K-C (2002) Nonenzymatic antioxidant activity of four organosulfur compounds derived from garlic. *J Agric Food Chem* 50: 6143-6147.
32. Casella S, Leonardi M, Melai B, Fratini F, Pistelli L (2013) The role of diallyl sulfides and dipropyl sulfides in the *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of garlic, *Allium sativum* L., and leek, *Allium porrum* L. *Phytother Res* 27: 380-383.
33. Arranz N, Haza AI, García A, Möller L, Rafter J, Morales P (2007) Protective effects of organosulfur compounds towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. *Food Chem Toxicol* 45: 1662-1669.
34. García A, Morales P, Arranz N, Delgado ME, Rafter J, Haza AI (2009) Antiapoptotic effects of dietary antioxidants toward N-nitrosopiperidine and N-nitrosodibutylamine-induced apoptosis in HL-60 and HepG2 cells. *J Appl Toxicol* 29: 403-413.
35. Bradford, M (1976) A rapid sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
36. Borenfreud, E, Puerner, JA (1984) A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assays. *J Tissue Cult Meth* 9: 7-9.
37. Baltrop, JA, Owen TC, Cory AH (1991) 5-((3-carboxyphenyl)-3-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 2-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenylterazolium bromide (MTT) reducing to purple water soluble formazan as cell viability indicators. *Bioorg Med Chem Lett* 1: 611.
38. Mehri F, Auger J, Rendu F, Bauvois B (2008) *Allium* compounds, dipropyl and dimethyl thiosulfates as antiproliferative and differentiating agents of human acute myeloid leukemia cell lines. *Biologics* 2(4): 885-895.
39. Hong Y-S, Ham Y-A, Choi J-H, Kim J (2000) Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expressions of Bcl-2, Bax, and p53 in non small cell lung cancer cell lines. *Exp Mol Med* 32(3): 127-134.
40. Fukao T, Hosono T, Misawa S, Seki T, Ariga T (2004) The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride. *Food Chem Toxicol* 42: 743-749.
41. Liu K-L, Chen H-W, Wang R-Y, Lei Y-P, Sheen L-Y, Lii C-K (2006) DATS reduces LPS-Induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF-KB activation in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 54: 3472-3478.