

ارزیابی فعالیت ضد قارچی نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم واتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید بر مهار رشد سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس

چکیده:

مقدمه و هدف: در سال‌های اخیر شیوع قارچ‌های فرصت طلب افزایش چشمگیری یافته است. عفونت‌هایی که به وسیله قارچ‌های پاتوژن شایع ایجاد می‌شوند از مشکلات شاخص افراد دچار نقص سیستم ایمنی می‌باشند. هدف از این مطالعه ارزیابی خواص ضد قارچی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک اسید بر مهار رشد سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس بود.

مواد و روش‌ها: این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم از طریق هیدرولیز تتراکلریدتیتانیوم به دست آمدند. اندازه و نوع ذرات به ترتیب به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ و پراش پرتو ایکس تعیین شدند. تست حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی دی‌اکسید تیتانیوم و اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک‌اسید ارزیابی و مقایسه گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: غلظت دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده $7/03$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و $5/63 \times 10^{-2}$ ذره در میلی‌لیتر تعیین شد. بررسی شکل و قطر نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ نشان داد که ذرات کروی با قطر $65-40$ نانومتر می‌باشند. حداقل غلظت مهارکنندگی 50 ، دی‌اکسید تیتانیوم، اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک اسید و فلوکونازول به ترتیب $2/2$ ، $1/24$ و $0/125$ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت مهارکنندگی 90 ، $3/51$ ، $2/48$ و $0/5$ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی $4/06$ ، $3/1$ و 1 میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که سنتز نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم با روش شیمیایی دارای خاصیت ضد کاندیدیایی مطلوبی نسبت به داروی فلوکونازول می‌باشد، از این رو نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم می‌تواند کاندید مناسبی جهت حذف کاندیدا در حیطه پزشکی به ویژه در ارتباط با وسایل پزشکی باشد.

واژه‌های کلیدی: اثر ضد قارچی، کاندیدا آلبیکنس، نانوذرات

فروش حقیقی*

شهلا رودبار محمدی**

پریسا محمدی***

مهدی اسکندری****

* دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی
** دکترای قارچ‌شناسی، استادیار دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی
*** دکترای میکروپ شناسی محیطی، استادیار دانشگاه الزهراء، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی
**** کارشناس ارشد مهندسی نانومواد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده فنی مهندسی، گروه مهندسی نانومواد

تاریخ وصول: ۱۳۸۹/۳/۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۴/۱

مؤلف مسئول: شهلا رودبار محمدی

پست الکترونیک: Sh.mohammadi@modares.ac.ir

مقدمه

کاندیدیازیس بیماری قارچی شایعی است که به وسیله گونه‌های مختلف جنس کاندیدا ایجاد شده و قسمت‌های مختلفی از بدن را درگیر می‌نماید. این عفونت‌ها با توجه به وضعیت سیستم ایمنی میزبان می‌توانند در حد مهلک پیش روند و به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر به ویژه در بیماران بستری مطرح می‌باشند (۱ و ۲).

کاندیدا آلبیکنس چهارمین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی است که معمولاً به دنبال آلودگی ابزارها و تجهیزات پزشکی ایجاد می‌شود. وجود و گسترش این گونه عفونت‌ها بر روی تجهیزات پزشکی می‌تواند منبع مناسبی جهت انتشار آلودگی از یک نقطه بدن به سمت اندام‌های داخلی و یا انتقال به فرد دیگر باشد (۳)، لذا استفاده از مواد خود پاک شونده دارای خاصیت ضد قارچی ضمن حذف عوامل قارچی از سطوح و وسایل می‌تواند به عنوان یک اقدام پیشگیری کننده مطرح گردد. از مواد دارای خاصیت ضد میکروبی که از اهمیت خاصی برخوردارند نانوذرات اکسید روی^(۱)، دی‌اکسید تیتانیوم^(۲) و اکسید نقره^(۳) می‌باشند. در سال‌های اخیر سنتز نانوذرات به علت خواص الکتریکی، نوری و قابلیت چگالش بهتر، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این میان نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم خواص الکتریکی، نوری و فتوکاتالیستی خوبی از خود نشان داده اند (۴).

دی‌اکسید تیتانیوم پودری سفید رنگ است که از ذوب تیتانیوم در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد و یا از انحلال تیتانیوم در اسید نیتریک گرم و غلیظ تهیه می‌شود (۵). کاربرد و کارایی دی‌اکسید تیتانیوم تحت تأثیر ساختار بلوری شکل و اندازه ذرات آن است (۶). بنابراین تلاش‌های بسیار زیادی برای تولید نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در زمینه‌های کاتالیستی و فتوکاتالیستی انجام می‌شود (۷).

هدف از این مطالعه ارزیابی خواص ضد قارچی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک اسید بر مهار رشد سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس بود.

مواد و روش‌ها

این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس ای‌تی‌سی‌سی^(۴) ۱۰۲۳۱ تهیه شده از دانشگاه تهران، بر روی محیط سابرو دکستروز آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از طی شدن مدت زمان انکوباسیون از نمونه قارچی جهت تهیه سوسپانسیون مخمری استفاده گردید. برای این کار ابتدا از کلنی کشت داده شده بر روی محیط

1-ZNO
2-Tio2
3-AgO
4-American Type Culture Collection(ATCC)

سابورو دکستروز آگار برداشت شد و در یک میلی‌لیتر بافر فسفات سالین^(۱) با اسیدیته برابر ۷/۲ استریل مخلوط گردید، سپس تعداد سلول‌های مخمری به وسیله لام نئوبار شمارش شد و از آن سوسپانسیون به غلظت 1×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر تهیه گردید.

جهت سنتز نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم از هیدرولیز تتراکلریدتیتانیوم^(۲) استفاده شد. در این روش ۱ میلی‌لیتر از پیش ماده تتراکلریدتیتانیوم به آهستگی به آب مقطر دیونیزه دو بار تقطیر (به عنوان حلال نانوذره) افزوده گردید و در آن حل شد. پس از گذشت ۵ ساعت و انجام واکنش، هیدرولیزاسیون و پلی‌مریزاسیون، دی‌اکسید تیتانیوم کلوئیدی (سُل) به دست آمد. این محلول در دمای ۸۰-۱۰۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد و سپس در کوره با حرارت ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفته تا پودری سفید حاصل شد.

جهت انجام تست میکرودایلوشن رقت‌های متوالی از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و اتیلن دی‌آمین تتراکسید تهیه گردید (۹).

برای تهیه رقت‌های مختلف از فلوکونازول ابتدا ۰/۱۲۸ گرم از پودر فلوکونازول خریداری شده از شرکت سیگما در یک میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید (به عنوان حلال دارو) حل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. سپس غلظت‌های متوالی از آن تهیه شده و با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتری استریل شد.

برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی^(۳) دی‌اکسید تیتانیوم بر روی رشد کانیدیا آلبیکنس از طریق تست رقت‌سازی و شمارش تعداد کلنی‌های تشکیل شده^(۴)، پس از تهیه استوک‌های ۲۰۰-۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول کلوئیدی مطابق با استاندارد با استفاده از پلیت ۹۶ خانه‌ای میکروتیتر، تست رقت‌سازی انجام گردید (۹).

برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی اتیلن‌دی‌آمین‌تتراکسید و فلوکونازول بر روی رشد کانیدیا آلبیکنس از طریق تست رقت‌سازی و شمارش تعداد کلنی‌ها استفاده شد. پس از تهیه رقت‌های مختلف از پودر اتیلن‌دی‌آمین‌تتراکسید - اسید و فلوکونازول با استفاده از پلیت ۹۶ خانه‌ای میکروتیتر، تست رقت‌سازی انجام گردید (۹).

به منظور شناخت بیشتر و بررسی ساختار کریستالی دی‌اکسید تیتانیوم به کار رفته در آزمایش‌ها از میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ^(۵) و دستگاه پراش پرتو ایکس استفاده شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS^(۶) و آزمون آماری مجذور کای^(۷) تجزیه و تحلیل شدند.

1-Phosphate Buffered Saline (PBS)
2-Titanium tetrachloride(TiCL4)
3-Minimum Inhibitory Concentration(MIC)
4-Colony Forming Unit (CFU)
5-Scanning Electron Microscope(SEM)
6- Statistical Package for Social Sciences
7-Chi-Square Test

یافته‌ها

نتایج نشان داد که غلظت نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده $7/03$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و $10 \times 5/63$ ذره در میلی‌لیتر بود و همچنین نتایج میکروسکوپ الکترونی و تکنیک پراش اشعه ایکس نشان داد ماده سنتز شده دی‌اکسیدتیتانیوم با ابعاد $65-40$ نانومتر می‌باشد.

به دنبال شمارش تعداد کلنی‌های رشد یافته از هر یک از رقت‌های مورد آزمون دی‌اکسیدتیتانیوم و اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک اسید نسبت به گروه کنترل (آب مقطر و دی‌متیل سولفوکساید $0/05$ درصد) توانایی از بین بردگی قارچ کاندیدا برای هر یک از عوامل دی‌اکسید تیتانیوم و اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک اسید و فلوکونازول به دست آمد. بدین ترتیب حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (توان کشندگی 50 درصد و 90 درصد قارچ کاندیدا به طور مجزا) و حداقل غلظت کشندگی قارچ^(۱) تعیین گردید.

در غلظت $2/2$ میکروگرم بر میلی‌لیتر از دی‌اکسیدتیتانیوم و غلظت $1/24$ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک اسید 50 درصد کاهش رشد نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید که به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی 50 گزارش گردید. در غلظت $3/51$ میکروگرم بر میلی‌لیتر از دی‌اکسید تیتانیوم و غلظت $2/48$ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک اسید 90 درصد کاهش در رشد کلنی‌های قارچی مشاهده شد و به عنوان

حداقل غلظت مهارکنندگی 90 گزارش گردید و همچنین در غلظت $4/06$ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول کلوئیدی دی‌اکسیدتیتانیوم و غلظت $3/1$ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک اسید هیچ‌گونه رشدی در پلیت‌های کشت داده شده مشاهده نگردید که این غلظت به عنوان غلظت کشندگی کامل قارچ گزارش گردید. به همین ترتیب حداقل غلظت مهارکنندگی 50 ، 90 و نیز کمترین غلظت کشندگی قارچ برای داروی فلوکونازول به ترتیب $0/5$ ، $0/125$ و 1 گزارش گردید (جدول ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر عفونت‌های قارچی منتشره ایجاد شده به وسیله گونه‌های کاندیدا به دلیل افزایش بیماری‌های سرکوب کننده ایمنی مانند ایدز، اختلالات هماتولوژیک و بدخیمی‌ها شیوع بیشتری یافته است و از طرفی میکروب‌ها نیز روز به روز مقاومت دارویی بیشتری را نشان می‌دهند (11 و 8). به همین منظور یافتن ترکیباتی که بتوانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضد قارچی رایج باشند از اهم موضوعات ضروری برای تحقیق می‌باشند، لذا هدف از این مطالعه ارزیابی خواص ضد قارچی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک اسید بر مهار رشد سویه استاندارد کاندیدا آلیکنس بود.

1-Minimal Fungicide Concentration(MFC)

جدول ۱: مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید و فلوکونازول بر سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس

میزان حداقل غلظت کشندگی (میکروگرم بر میلی لیتر)	میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (میکروگرم بر میلی لیتر)	محدوده غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)	مهارکننده
۴/۰۶	۳/۵۱	۲/۲	نانوذرات دی اکسید تیتانیوم
۳/۱	۲/۴۸	۱/۲۴	اتیلن دی آمین تترا استیک اسید
۱	۰/۵	۰/۱۲۵	فلوکونازول

نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بسیار دارای اهمیت می باشد (۶).

پاواسپوری و همکاران (۲۰۰۵)^(۴) از روش سل - ژل با استفاده از یک ماده فعال کننده سطحی و کولن و همکاران (۲۰۰۲)^(۵) از روش سل - ژل بر روی یک بستر از جنس کربن فعال شده جهت سنتز دی اکسید تیتانیوم استفاده کردند. این محققین روی عوامل میکروبی کار نکرده بودند (۱۶ و ۱۵).

در تحقیق حاضر از تترا کلرید تیتانیوم جهت سنتز نانوذرات دی اکسید تیتانیوم استفاده شد (۵). دی اکسید تیتانیوم دارای سه ساختار بلوری آناتاز، روتال و بروکیت می باشد و از نظر ترمودینامیکی روتال پایدارترین فاز دی اکسید تیتانیوم در فشار و دمای معمول بوده و دو فاز دیگر نیمه پایدار می باشد (۱۸ و ۱۵). در این ساختار بلوری در هر سه فاز به فرم هشت وجهی بوده و تفاوت در نحوه

شی و همکاران (۲۰۰۸)^(۱) به خاصیت ضد میکروبی امولسیون ترکیبی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و کیتوزان نسبت به باکتری اشرشیاکولی و قارچ آسپرژیلوس نایجردست یافتند (۱۲). ژانگ و همکاران (۲۰۰۸)^(۲) در یک مطالعه ضمن استفاده از اشعه اولتراویولت اثر ضد میکروبی ترکیبی از پلی اورتان و دی اکسید تیتانیوم را بر روی اشرشیاکولی و کاندیدا آلبیکنس بررسی کردند، اما گزارشی از حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی قارچ با استفاده از روش رقت سازی در محیط مطرح نکردند (۱۳). چن و همکاران (۲۰۰۹)^(۳) با تشکیل سطوح نازکی از دی اکسید تیتانیوم بر روی چوب مرطوب از رشد قارچ آسپرژیلوس نایجر جلوگیری کردند. در این مطالعه نیز به حداقل مهار رشد و کشندگی قارچ اشاره ای نشده بود (۱۴).

خواص نانوذرات دی اکسید تیتانیوم به اندازه ذرات و اصلاحات سطحی انجام شده بر روی آن ها بستگی دارد که به نوبه خود تحت تأثیر روش سنتز نانوذرات می باشند. به همین دلیل روش های سنتز

1-Shi et al
2-Zhang et al
3-Chen et al
4-Pavaspuree et al
5-Colon et al

بیمارستان‌ها دارد (۲۲). هم‌چنین غلظت زیاد اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک اسید با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌تواند بر پایداری غشاء سلول‌های یوکاریوتی تأثیر بگذارد، در نتیجه از سایر مواد دارای خاصیت ضد قارچی با توجه به مقاومت‌های دارویی در پزشکی و صنعت پزشکی استفاده می‌شود (۲۳).

با توجه به نتایج این تحقیق و مطالعه‌های سایر محققین می‌توان به این نانوذرات به عنوان یک ماده از بین برنده شایع‌ترین قارچ پاتوژن جامعه که توانایی آلوده کردن سطوح اشیاء و تجهیزات پزشکی مانند، کاتتر و ایمپلنت‌ها را نیز دارد، توجه نمود و کاربردهای بسیاری در زمینه بهداشتی، درمانی و صنعتی برای آن در نظر گرفت، لذا شناسایی و معرفی عوامل و مواد این‌چنینی که دارای خاصیت ضد میکروبی هستند، امروزه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. با توجه به این نتایج پیشنهاد می‌شود که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم را می‌توان جهت پوشش دهی سطوح مختلف مانند؛ تخت و وسایل اتاق عمل، چادر اکسیژن، کاتترهای وریدی و دیالیزی و کلیه سطوح قابل پوشش‌دهی در مراکز بهداشتی - درمانی استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

قرارگیری این هشت وجهی‌ها، سه فاز مختلف را ایجاد می‌کند. مطالعه اخیر نشان داد که دو سوم حجم دی‌اکسید سنتز شده در فرم روتال و یک سوم حجم کلونید دارای فاز آنتاز بوده است. با انجام تست میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ نشان داده شد که ذرات دارای ابعاد ۴۵-۴۰ نانومتر می‌باشند. این ذرات با غلظت ۴/۰۶ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای حداقل غلظت کشندگی علیه سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس می‌باشند (۱۹).

معمولاً در دمای پایین، دی‌اکسید تیتانیوم به صورت فاز آنتاز متبلور می‌شود، با افزایش دما فاز نیمه پایدار آنتاز به فاز پایدار روتال تبدیل می‌شود (۲۱ و ۲۰، ۱۷). برای دی‌اکسید تیتانیوم این تغییر حالت معمولاً در دمای بالاتر از ۸۰۰ درجه سانتی‌گراد رخ می‌دهد. مطالعه بر روی دی‌اکسید تیتانیوم نشان داد که دارای خواص ضد کاندیدایی قابل توجه و مناسبی در مقایسه با سایر مهارکننده‌های رشد قارچی دارا می‌باشند (۲۰).

در این مطالعه خاصیت ضد قارچی نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و ماده اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک اسید با داروی ضد قارچی رایج (فلوکونازول) مقایسه شد.

از آنجا که اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک اسید با کلات کردن کاتیون‌های دو ظرفیتی غشای خارج سلولی موجب افزایش نفوذپذیری غشاء و در نتیجه مرگ میکروارگانیسم می‌شود، کاربرد وسیعی در ضد عفونی کردن وسایل بهداشتی و پزشکی در

The Evaluation of Antifungal Activity of Titanium Dioxide Nanoparticles and Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid on Growth Inhibition of Standard Strain of *Candida albicans*

Haghighi F^{*},
Rodbar Mohammadi SH^{**},
Mohammadi P^{***},
Eskandari M^{****}.

^{*}MSc in Medical Mycology,
Department of Medical science,
Tarbiat Modares University, Tehran,
Iran

^{**}Assistant Professor of Medical
Mycology, Department of Medical
science, Tarbiat Modares University,
Tehran, Iran

^{***}Assistant Professor of
Environmental Microbiology,
Department of biology,
Alzahra university, Tehran, Iran

^{****}MSc in Nanomaterial Engineering,
Department of Nanomaterial
Engineering, Tarbiat Modares
University, Tehran, Iran

Received:22/05/2010

Accepted:22/06/2010

Corresponding Author: Rodbar
Mohammadi SH
Email:sh.mohammadi@modares.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: In recent years, the incidence of opportunistic fungi has shown a marked increase. Infection caused by common pathogenic fungi is a significant health problem in immune compromised hosts. The present study evaluated antifungal activity of Titanium dioxide nanoparticles and Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid against *Candida albicans* as self-cleaning agent by standard micro dilution test.

Materials & Methods: The present study was conducted at the Medical University of Tarbiyat Modares in 2009. TiO₂ nanoparticles were obtained through the hydrolysis of TiCl₄ (Titanium tetrachloride). Size and type of these nanoparticles were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and X-Ray-Diffraction (XRD). Afterwards, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicide Concentration (MFC) test for TiO₂ and EDTA were performed.

Results: Concentration of synthesised TiO₂ was 7.03 mg/ml and 5.63 5.63×10^{20} particles/ml. Evaluation of morphology and diameter of the TiO₂ nanoparticles with SEM showed that nanoparticles were spherical with diameter between 40-65 nm. MIC₅₀ of 2.2, 1.24 and 0.125 μ g/ml respectively. MIC₉₀ and MFC of TiO₂, EDTA and fluconazole were 3.51, 2.48, 0.5 μ g/ml and 4.06, 3.1, 1 μ g/ml respectively.

Conclusion: In the present study, using of synthesized TiO₂ nanoparticles with chemical method showed a suitable activity against *Candida* in comparison with Fluconazole. Thus it might represent a good candidates in elimination of *Candida* in medical from medical devices.

Key Words: Antifungal effect, *Candida albicans*, nanoparticles.

REFERENCES:

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 2007; 20:133–63.
2. Safdar A, Bannister TW, Safdar Z. The predictors of outcome in immunocompetent Patients with hematogenous candidiasis. *International Journal of Infectious Diseases* 2004; 8: 180–6.
3. Dominic RM, Shenoy S, Baliga S. Candida biofilms in medical devices: Evolving trends. *Kathmandu University Medical Journal* 2007; 5 (3): 431-6.
4. Kim KD, Lee TJ, Kim HT. Optimal conditions for synthesis of TiO₂ nanoparticles in semi-batch reactor. *Colloids and surfaces A. Physicochem Eng Aspects* 2003; 224:1-9.
5. Liao DL, Liao BQ. Shape size and photocatalytic activity control of TiO₂ nanoparticles with surfactants. *Journal of Photochemistry and Photobiology A Chemistry* 2007; 187: 363–9.
6. Gao Y, Masuda Y, Seo WS, Ohta H, Koumoto K. TiO₂ nanoparticles prepared using an aqueous peroxotitanate solution. *Ceramics International* 2004; 30:1365–8.
7. Akiba N, Hayakawa I, Keh ES, Watanabe A. Antifungal effect of a tissue conditioner coating agent with TiO₂ photocatalyst. *J Med Dent Sci* 2005; 52: 223–7.
8. Kojic EM, Darouiche RO. Candida infections of medical devices. *Clinical Microbiology Reviews* 2004; 14: 255–67.
9. Pujol I, Capilla J, Fernández-Torres B, Ortoneda M, Guarro J. Use of the sensitive colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *J Clin Microbiol J Clin Microbiol* 2002; 40(7): 2618-21.
10. Eskandari M, Ahmadi V. Fabrication and characterization of the ZnO nanorods by chemical solution method. A thesis presented for degree of master of science, department of material science engineering, Tarbiat Modares University, 2008.
11. Boerlin P, Boerlin PF, Ddurussel C. Cluster of atypical Candida isolates in a group of human immunodeficiency virus positive drug users. *J Clin Microbiol*, 2002; 40(7):2614-21.
12. Shi L, Zhao Y, Zhang X, Su H, Tan T. Antibacterial and anti-mildew behavior of chitosan/nano-TiO₂ composite emulsion. *Korean J Chem Eng* 2008; 25(6): 1434-8.
13. Zhang X, Su H, Zhao Y, Tan T. Antimicrobial activities of hydrophilic polyurethane/titanium dioxide complex film under visible light irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A Chemistry* 2008; 199: 123–9.
14. Chen F, G Yang X, Wu Q. Antifungal capability of TiO₂ coated film on moist wood. *Building and Environment* 2009; 44: 1088–93.
15. Pavasupree S, Suzuki Y, Art SP, Yoshikawa S. Synthesis and characterization of nanoporous nanorods nanowires metal oxides sci. *Tech Adv Mater* 2005; 6: 224–9.
16. Colón G, Hidalgo MC, Navío JA. A novel preparation of high surface area TiO₂ nanoparticles from alkoxide precursor and using active carbon as additive. *Cata Today* 2002; 76: 91–101.
17. Li Y, White TJ, Lim SH. Low temperature synthesis and microstructural control of titania nanoparticles. *J Solid State Chem* 2004; 177: 1372-81.
18. McCormick J. Chemistry of TiO₂ Nanoparticles", PhD Thesis, Faculty of the University of Delaware, summer 2006.
19. Li W. Metal organic Chemical Vapor Deposition and Characterization of TiO₂ Nanoparticles. PhD Thesis, Faculty of the University of Delaware, winter 2004.
20. Yuan Z, Zhang L. Influence of zno+fe₂o₃ additives on the anatase-to-rutile transformation of nanometer tio₂ powders. *NanoStruc Mater* 1998; 10:1127-33.
21. Dhage SR, Samuel V, Ravi V. Synthesis of nanocrystalline tio₂ at 100°C. *Mater Letters* 2004; 58: 2310-13.
22. Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JI. Inhibition on candida albicans biofilm formation using divalent cation chelators (EDTA). *Mycopathologia* 2007; 164: 301–6.
23. Prachayasittikul V, Isarankura-na-ayudhya C, Tantimongolwat T, Nantaenamat C, Galla HJ. EDTA-induced membrane fluidization and destabilization: biophysical studies on artificial lipid membranes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2007; 39(11): 901–13.
24. Inabo HI. The significance of candida infections of medical implants. *Scientific Research and Essay* 2006; 1(1): 8-10.